Глава 2

Генетические основы выбора животных-моделей

Теория эволюции Дарвина совершила поворот от *дискретности* видов к *непрерывности* их эволюции. Несмотря на различия, в имеющихся формах жизни существуют и сходные черты. Хотя Дарвин и описывал различия для определения специфических черт, он описывал и подобные черты, характерные для всех видов, при которых человек, который согласно догмам религий создан Богом, имел тот же путь развития, что и животные. Современный синтез теории Дарвина, генетики и фармакологии также акцентирует внимание на *непрерывности*, демонстрируя подобия на биохимическом, анатомическом, физиологическом и поведенческом уровнях.




Анализ темы *подобия* через концепции *биоцентризма*, теории *взаимодействия систем*, теории *энтропии, хаоса*, познавательной *этологии* и *генной инженерии* показывает, что животные имеют значительное количество подобных человеку черт в интеллектуальных, социальных и зоосоциальных областях, а также в физиологических, генетических функциях и в аргументах *изоморфизма*, которые изложены в предыдущей монографии [13].

Пространство генетического полиморфизма

В живых организмах гены определяют любую клеточную реакцию, клеточное деление, рост и развитие организма. Наследование биологических признаков, таких как рост, предрасположенность к болезням, было отмечено еще во времена, когда о генах не было известно. Практический опыт изменения свойств селекционируемого организма позволил выдвинуть идею о наличии единиц наследственности. Эти предположения были подтверждены в середине XIX столетия Грегором Менделем. Мендель своими классическими экспериментами за-

ложил основы генетики и сформулировал гипотезу о наличии генов, определяющих признаки аллелей [18]. Им были введены понятия *фенотипа* и *генотипа*. Работы Менделя были предопределены исследованиями экспериментаторов XVII – начала XIX вв., таких, как Иосиф Кельрейтер и Карл Ван Гарнер, которые разработали подходы к селекции и созданию гибридов растений. Но именно Мендель описал закономерности, которые стали стимулом к последующему развитию не только *генетики*, но и *всей биологии и биомедицины*.

Чарльз Дарвин в книге «Изменения у животных и растений при одомашнивании», опубликованной на два года позднее знаменитой работы Менделя, предположил, что каждая часть тела постоянно производит собственные копии, которые он назвал «*геммулы*». В 1890-х годах Карл Корренс и Хьюго де Вриз независимо пришли к тем же заключениям, что и Мендель.

Немецкие биологи Маттиам Шлейден и Теодор Шванн в 1840-х годах установили, что все растения и животные состоят из микроскопических автономных единиц, названных клетками. Затем были обнаружены внутриядерные структуры, связанные с наследственностью и названные *хромосомами*. Фредерик Шнайдер в 1873 г. описал их как волокнистую массу, ассоциированную с ядром, наблюдаемую при клеточном делении, а Вальтер Флеминг назвал этот процесс митозом и ввел термины «*хроматин*», «*диплоид*» и «*тетраплоид*» [34].

В 1960-х годах произошло открытие мРНК, обеспечивающей связь между ядром, участком синтеза белка в цитоплазме и внехромосомного элемента генома – *плазмиды*, которые участвуют в передаче генов. Открытие *обратной транскриптазы* Х. Теминым и Д. Балтимором в 1970 г. показало возможность некоторых вирусов, называемых ретровирусами, делать копии ДНК с РНК. Обратная *транскриптаза* (ревертаза) обеспечивает интеграцию генетического материала ретровирусов в геном клетки хозяина.

В семидесятых годах были разработаны два новых подхода к определению нуклеотидных последовательностей в ДНК. У. Жильберт в 1977 г. определил наличие *экзонов* и *интронов*, а Р. Робертс и П. Шарп в 1993 г. разработали понятие *сплайсинга*, который представляет собой вырезание из предшественника РНК интронов и ковалентное соединение экзонов с образованием зрелых молекул мРНК. Возможность ДНК *in vitro* производить белок соответствующими методами дала толчок развитию биотехнологической промышленности [34].

Эти исследования определили биомедицинские направления создания *трансгенных линий животных*. В настоящее время можно направленно получать практически любые линии животных с заданны-

ми параметрами генотипа и фенотипа. Следует лишь корректно сформулировать цели и задачи. Особая роль при направленном создании инбредных и трансгенных линий животных принадлежит явлениям *генополиморфизма*.

NB! Полиморфизм или явление индивидуальной прерывистой изменчивости живых организмов выражается наличием в одной и той же популяции «двух или более хорошо различимых форм, способных появляться в потомстве одной самки и встречающихся с частотой, достаточно высокой для того, чтобы исключить поддержание самой редкой из них повторяющимися мутациями» [29].

Инбреды или гибриды — выбор экспериментаторов. Многие лаборатории могут получить хорошие результаты в ходе регулярного, например, ежемесячного исследования тех характеристик животных, которые для последующих исследований являются наиболее важными. Резкие изменения результатов могут быть связаны с влиянием либо генетики, либо окружающей среды, но в любом случае исследователи узнают об этом и имеют возможность изучать причины изменения, включая факторы плодовитости и поведения. Это основа выбора животных для эксперимента, особенно при оценке действия лекарств и фармакомоделировании.




Плодовитость должна отслеживаться регулярно для обеспечения эффективного управления воспроизводственной колонии. Внезапный и резкий рост плодовитости должен быть тщательно исследован, поскольку он может быть вызван *гибридной мощью*, являющейся результатом спаривания, противоречащего обычной системе размножения данного организма. Хорошо известно, что *гибриды F1* обычно воспроизводятся гораздо лучше, чем инбреды. Так, несмотря на то, что для повышения плодовитости при регулярном ведении воспроизводственных колоний рекомендована селекция, к очень большим пометам следует относиться с некоторым подозрением, если существует вероятность того, что генетическая контаминация уже имела место.

Поведение должно изучаться экспериментаторами тщательно (хотя обычно субъективно). Многие линии обладают спокойным темпераментом, в то время как гибриды, как правило, бывают гораздо более нервными и активными. Так, если темперамент штамма меняется, то это должно стать поводом для тщательного исследования с применением ПЦР, способов пересадки кожи, исследования вариаций нижней челюсти, биохимических способов, геномных и протеомных методов.

Линейные или инбредные животные представляют закрепленный *инбридингом* генотип. Они гомозиготны и генетически однородны, обеспечивают полноценную воспроизводимость результатов и возмож-

ность их повторения в любой лаборатории. Генетическая однородность позволяет расходовать меньшее число животных для получения доказательных результатов [5, 6, 12, 13, 26, 40].

Напомним самые общие представления о том, что в инбредных линиях генетическая однородность или гомозиготность животных сохраняется постоянным спариванием родных братьев и сестер в племенном ядре линии. Эта линия представляет собой группу животных, размножаемую в соотношении 1:1 родных братьев и сестер и имеющую характерные признаки *однонуклеотидного полиморфизма*.

SNP – однонуклеотидный полиморфизм. Расшифровка последовательностей нуклеотидов всей ДНК и открытие новых *полиморфизмов* – генетических вариантов последовательностей нуклеотидов одного и того же участка ДНК у разных людей и животных – наполнили понятия множественного аллелизма. *Аллели* – это различные формы гена, то есть генополиморфизм, который обеспечивает участки ДНК, варьирующие у отдельных индивидов. Изменения в ДНК в виде замены или потери нуклеотидов и создают *однонуклеотидный полиморфизм* (*SNP*) (рис. 2.1).



Индивид	Последовательность
1	A G A G T T C T G C T C G
2	A G G G T T A T G C G C G
1	C G T T C G G G A A T C C
2	C G T T A G G A A A T C T
1	T C T T T G A C G A C T C
2	T C T T A G A G G A C T C

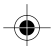


Рис. 2.1. Примеры однонуклеотидного полиморфизма у двух индивидов. На рисунке приведены три фрагмента ДНК двух индивидов; выделены однонуклеотидные различия в геномных последовательностях (*SNP*)

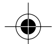
Полиморфизмы наблюдаются как в смысловых (*экзоны*), так и в несмысловых (*интроны*) участках генома. Однонуклеотидные полиморфизмы составляют основу генетической вариативности. Они встречаются по всему геному и отражают прошлые мутации. Длина генома составляет 3,2 млрд. пар нуклеотидов, а число однонуклеотидных полиморфизмов – более 15 млн. Люди на 99,9% идентичны по нуклеотидным последовательностям. Вся вариативность между людьми возникает за счет различий лишь в 1% генома [7]. В геноме человека несколько десятков тысяч генов, большинство из которых имеют размеры до 50 000 пар нуклеотидов. Размеры генов и число экзонов и интронов в генах людей и животных варьирует в довольно широких пределах (рис. 2.1), что должно непременно учитываться при фармакомоделировании.

Коэффициент инбридинга *F*

Увеличение частоты скрещивания генетически близких особей, возникающее при неслучайной ассоциации гамет, приводит к неслучайному скрещиванию или инбридингу. Для исследования популяции с инбридингом С. Райт [38] ввел коэффициент *F*, описывающий отклонение частот генотипов от равновесия Харди-Вайнберга.

NB! Правило Харди-Вайнберга отражает состояние неизменности генетического состава неограниченной по численности популяции, существующей вне среды, при условии свободного скрещивания или панмиксии.

Коэффициент инбридинга *F* получен С. Райтом при помощи корреляционного анализа и формальной логики, когда, например, значение 1 присваивается аллелю А, а значение 0 – аллелю *a*. Ассоциации гамет в популяции превращаются в ряды генетических значений и тогда *Y* соответствует спермиям, а *X* – яйцеклеткам. Частоты типов скрещивания (см. табл. 2.1) позволяют оценивать коэффициент корреляции r_{XY} между значениями *X, Y* и его тождественность коэффициенту *F*:




$$r_{XY} = \frac{\overline{XY} - \overline{X}\,\overline{Y}}{\sqrt{\left(\overline{X^2} - \overline{X}^2\right)\left(\overline{Y^2} - \overline{Y}^2\right)}} = \frac{p^2(1-f) + pf - p^2}{p - p^2} = F. \qquad (2.1)$$

Вычисление *F* инбридинга для самооплодотворения, скрещивания между сибсами и т.д. непосредственно следует из определения этого коэффициента и подробно рассмотрено в литературе [2, 31].

Частоты генотипов в спонтанной популяции, сопоставленные с частотами генотипов в популяции с инбридингом (1·1), дают следующие параметры *F* инбридинга:

$$F = \frac{Vq}{q(1-q)}. \qquad (2.2)$$

Выраженность генетических различий между особями положительно коррелирует со значениями дисперсии *Vq*. Поскольку случаи полной изоляции субпопуляций достаточно редки в природе, то существует естественный баланс между убылью гетерозигот и, в результате миграции генов между субпопуляциями, увеличением доли гетерозигот.

С. Райт [39] на основании коэффициента инбридинга *F* ввел и обосновал различные показатели генетического разнообразия, при которых каждый из этих коэффициентов соответствует значению *F* в фор-

муле (2.2) для дисперсии Vq на разных уровнях иерархической структуры подразделенной популяции:
коэффициент инбридинга особи относительно большой популяции F_{IT}

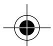
$$F_{IT} = \frac{\sum_i Ni\left(Qi - q^2\right)}{Nq(1-q)}; \qquad (2.3)$$

коэффициент инбридинга особи относительно субпопуляции F_{IS}

$$F_{IS} = \frac{\sum_i Ni\left(Qi - q_i^2\right)}{Nq(1-q)}; \qquad (2.4)$$

коэффициент инбридинга субпопуляции относительно большой популяции F_{ST}

$$F_{ST} = \frac{\sum_i Ni\left(qi - q^2\right)}{Nq(1-q)}, \qquad (2.5)$$

где N_i, q_i, Q_i – соответственно численность, частота гена *a* и частота генотипа *aa* для *i*-й субпопуляции, а q – частота гена *a* во всей популяции. При одинаковой численности субпопуляций $q = \overline{q}$, иначе $q = N^{-1}\sum N_i q_i$. При этих условиях коэффициенты инбридинга F_{IT}, F_{IS}, F_{ST} подразделенной популяции удовлетворяют тождеству:

$$1 - F_{IT} = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST}).$$

Если субпопуляции находятся в состоянии равновесия Харди-Вайберга, то при соотношении $Q_i = q_i^2$, приведенное выше тождество

Таблица 2.1

Частоты возможных типов скрещивания и статистические характеристики генетических значений *X*, *Y*, сопоставленных ассоциирующим гаметам

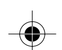
Спермии	Яйцеклетка	Частота скрещивания	Генетические значения				
			Y	*X*	Y^2	X^2	*XY*
A	A	$p^2(1-F)+pF$	1	1	1	1	1
A	a	$pq(1-F)$	1	0	1	0	0
a	A	$qp(1-F)$	0	1	0	1	0
a	a	$q^2(1-F)+qF$	0	0	0	0	0
Средние значения			*p*	*p*	*p*	*p*	$p^2(1-F)+pF$

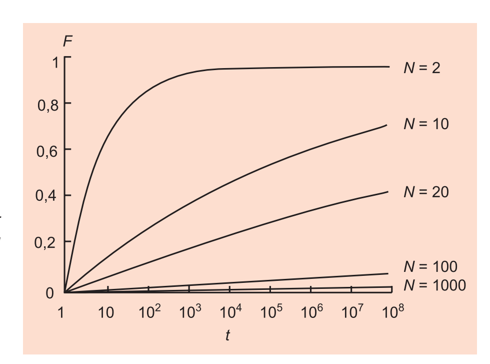
сводится к равенству $F_{IT} = F_{ST}$, а коэффициент инбридинга особи относительно субпопуляции F_{IS} равен нулю.

С. Райт показал, что в окрестностях стабильной популяции численностью tN, значения F_t приобретают следующий вид:

$$F_t = \frac{1 - tc_t}{1 + tc_t}, \quad c_t = \frac{1}{t}\prod_{i=1}^{t-1}\left(1 - \frac{1}{iN}\right). \qquad (2.6)$$

В рамках модели изоляции значения коэффициента инбридинга F, рассчитанные по формуле (2.6) для различных численностей окрестности свободного скрещивания N, выявляют локальную дифференциацию, зависящую от размера *панмиктической окрестности* (рис. 2.2).





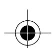


Рис. 2.2. Зависимость коэффициента инбридинга F от размера популяции t при различной численности особей N в пределах одной окрестности. Величина t определяет, во сколько раз численность популяции больше размера окрестности свободного скрещивания N

Размер *панмиктической единицы*, важнейшего фактора генетического процесса при изоляции расстоянием, приблизительно соответствует численности генетически активных особей внутри круга, радиус которого R равен удвоенному стандартному отклонению протяженности миграций в одном направлении, то есть

$$R = 2\sqrt{\frac{1}{n-1}\sum\left(d_i - \bar{d}\right)^2}, \text{ где } \bar{d} = \frac{1}{n}\sum_i d_i, \qquad (2.7)$$

суммирование ведется по всем парам родитель-потомок, n — число таких пар и d_i — расстояние между местом рождения родителя и его потомка из i-й пары родитель-потомок.

Уникальность инбредных отражений для биомоделирования

Линейные или инбредные животные представляют закрепленный инбридингом генотип. Они гомозиготны и генетически уникально однородны. Математическое моделирование в популяционной генетике строится на совокупности свободно скрещивающихся особей с

общим генофондом. Это исключительно трудоемкий процесс, поскольку даже сто двухаллельных локусов дают 3^{100} возможных генотипов в диплоидной популяции. Более того, из 60 000 генов генома человека не менее 30% являются полиморфными, что дает астрономическое количество возможных генотипов. Изучение всех популяций нереально, а значит, необходимы *репрезентативные* выборки. Достоверная величина выборки зависит от генетической структуры популяции и может быть установлена пилотным исследованием. Существуют разные оценки частоты гена. *Несмещенная* оценка означает математическое ожидание, которое совпадает с оцениваемым параметром. Наименьшая статистическая ошибка (дисперсия) при заданном объеме выборки N является *эффективной* оценкой. *Состоятельная* оценка устанавливается при величине объема выборки, стремящейся по вероятности к оцениваемому параметру.

Метод «прямого подсчета» генов обеспечивает получение несмещенных эффективных состоятельных оценок, которые были впервые разработаны Р. Фишером, или методом максимального правдоподобия (рис. 2.3) при инбридинге, как это проделано в работах Нила и Шелла и представлено в монографии [2].

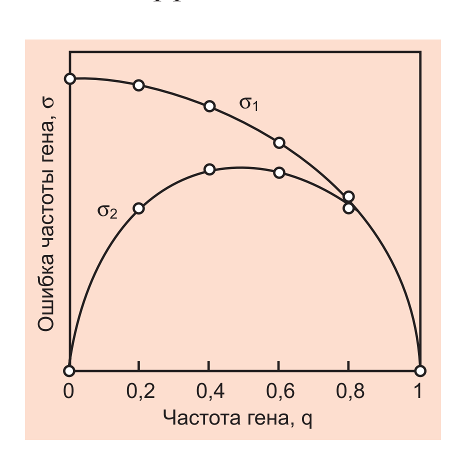
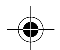


Рис. 2.3. Стандартные ошибки двух оценок частоты гена для случая одной пары аллелей в отсутствии доминирования. $\sigma_1 = \sqrt{(1-q^2)/4N}$ – частота аллеля найдена извлечением квадратного корня из доли гомозиготного генотипа, $\sigma_2 = \sqrt{q(1-q)/2N}$ – частота того же аллеля определена методом прямого расчета



NB! Линейные животные обеспечивают полноценную воспроизводимость результатов и возможность их повторения в любой лаборатории. Генетическая однородность позволяет расходовать меньшее число животных для получения доказательных результатов [1, 5, 12, 13, 25].

Если инбредная линия поддерживается в коллекции для сохранения ее уникального генотипа и нет необходимости в большом количестве животных, достаточно иметь племенное ядро и ограничиться работой с ним. Если животных необходимо тиражировать, то племядро передается в питомники. В филиалах Центра РАМН ведется работа по разведению линейных животных для использования в экспериментах. К работе с племенными ядрами ин-



бредных линий допускаются лица, имеющие биологическое или зоотехническое образование и прошедшие соответствующую стажировку. Но даже при тщательном соблюдении всех правил содержания инбредных животных существует опасность возникновения генетической изменчивости, гетерозиготности в высокоинбредных линиях. Причиной могут быть *спонтанные мутации* или *случайные скрещивания* [2, 5, 13, 26, 27].

NB! Если в процессе экспериментов было случайное скрещивание с животными другого генотипа, восстановить гомозиготность линии, сохранив исходный генотип, практически невозможно. Такие животные исключаются из дальнейших исследований.

Гарантия гомозиготности животных инбредных линий контролируется их однородностью по генетическим признакам. Для контроля генетической однородности инбредных линий мышей и крыс применяется *реципрокная изотрансплантация* кожи. Она позволяет контролировать гомозиготность по большому числу генов, так как совместимость тканей — *полигенный признак*. Этот прием дает возможность выявить очень слабые генетические различия между животными одной линии, обусловленные остаточной гетерозиготностью или спонтанными мутациями. Он технически достаточно прост и не требует больших материальных затрат. Мышей и крыс для контроля отбирают в возрасте 25-30 дней. Трансплантация осуществляется на 2- ... 3-месячных мышах и 3- ... 3,5-месячных крысах, но не раньше 6-недельного возраста. Существуют и другие методы, но их описание не входит в наши задачи.



NB! Каждый *инбредный штамм* представляет собой уникальное сочетание генетического материала, порождающее *уникальный фенотип.*

Многие такие фенотипные черты полезны в исследованиях, некоторые позволяют вывести «модели» болезней, прочие дают полезные физиологические, анатомические или поведенческие характеристики (примеры приведены в табл. 2.2).

Эти индивидуальности, хорошо отраженные в литературе, представляют одну из самых полезных инбредных черт. За последние годы кардинально изменились акценты в генетике поведения. Молекулярно-генетические технологии в генетике поведения стали революционным этапом, в корне преобразовавшим эту область.

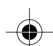
Геномика, как новая область генетики, стала развиваться после того, как были накоплены сведения о *внехромосомной ДНК*, находящейся в цитоплазме и ядрах клеток вне хромосом. Оказалось, что струк-

тура и функции ДНК намного сложнее. *Структурные гены*, которые кодируют полипептидную цепь или молекулу РНК, занимают лишь небольшую часть ДНК (примерно 3-5%). Множество межгенных участков с пока еще неясными функциями, образующих всю совокупность нуклеотидных последовательностей, также входят в геном, обеспечивая полный состав ДНК клетки.

Таблица 2.2

Некоторые примеры моделей болезней и интересующих характеристик в инбредных линиях мышей

Характеристика	**Линии**
Предпочтение спирта (10%)	C57BL, C57BR/cd
Агрессия/борьба	SJL, NZW
Аудиогенные судороги	DBA/2
Аутоиммунная анемия	NZB
Амилоидоз	YBR, SJL
Расщепление неба	CL, A
Синдром Чедиака – Хигаши	SB
Гипертония и/или пороки сердца	BALB/c, DBA/1, DBA/2
Гиперпролинемия и пролинурия	PRO
Ожирение и/или диабет	NZO, PBB, KK, AY
Остеоартропатия коленных суставов	STR/1
Полидипсия	SWR, SWV
Устойчивость к миксовирусным инфекциям	A2G
Опухоли:	
Лейкемия	AKR, C58, PL, RF
Ретикулоклеточная саркома (болезнь Ходжкина)	SJL
Опухоль легких	A
Гепатома	C3Hf
Опухоль молочной железы	C3H, C3H-4^{ny}, GRS/A, RIII
Овариальная тератома	LT
Приобретенная плазмацитома	BALB/c, NZB
Тестикулярная тератома	129/trSv
Полное отсутствие спонтанных опухолей	X/Gf
Расстройство питания	A2G




Гибридная мощь и инбредная депрессия

Хорошо известно, что животные из инбредных линий, как правило, обладают меньшей *генетической мощью* и более слабой детородной функцией по сравнению с большинством гибридов или аутбредным материалом. Это является результатом *инбредной депрессии*, общего ослабления готовности к воспроизводству в связи с повышением гомозиготности. Примечательной чертой такой депрессии является снижение показателей по всем параметрам, связанным с общей способностью производить молодняк, доживающий до полового созревания – «готовностью». Так, у мышей повышение коэффициента инбридинга на 10 процентов приводит в среднем к уменьшению величины помета на 0,6 и снижению веса в возрасте 6 недель на 0,58 г у самок. В качестве постулата принято считать, что противоположностью инбредной депрессии является *гибридная мощь* животных. Она поддается математическому описанию [13, 27, 39].

Когда измеряемая переменная является дискретной (мертвый/живой, респондер/нереспондер и т.д.), возможность рассчитать r_i сохраняется. Способ заключается в произвольном назначении величины 1 животному, находящемуся под воздействием, и 0 животному, не находящемуся под воздействием. Если n_i является общим количеством животных в i-м штамме, r_i из них не являются нормальными и имеются c штаммов с количеством животных, равным $N \Leftrightarrow \sum n_i$, то средний квадрат $D(x)$ между штаммами равен




$$D(x) = \left[\sum r_i^2 / n_i - \frac{(\sum r_i)^2}{N} \right] \Big/ (c-1), \qquad (2.8)$$

а средний квадрат в штаммах равен

$$D(y) = \left[\sum_i r_i - \frac{\sum_i r_i^2}{n_i} \right] \Big/ (N-c). \qquad (2.9)$$

Затем можно оценить внутриклассовую корреляцию по формуле:

$$r_i = \frac{[D(x) - D(y)]}{[D(x) + (k-1)D(y)]}, \qquad (2.10)$$

где

$$k = (N - \sum_i r_i^2 / N)/(c-1). \qquad (2.11)$$

Пример приводится в таблице 2.3

Таблица 2.3

Вариационный размах между нормальными и аномальными (после введения ацетазоламида) линиями мышей для качественной характеристики

Штамм	Нормальные	Аномальные	Итого
CBA/J	28	15	43
C57BL/6	38	33	71
A/J	18	8	26
DBA/2	15	6	21
C3H/He	57	5	62
SWR	29	1	30
BALB/c	34	21	55

Одна из проблем с расчетным значением r_i, полученным таким путем, заключается в том, что оно зависит от среднего уровня наблюдаемых аномалий.

$$D(x)=\left\{\left[\frac{15^2}{43}+\frac{33^2}{71}+...+\frac{1^2}{30}\right]-\frac{68^2}{253}\right\}/5=1{,}380 \quad (2.12)$$

$$D(y)=\left\{68-\left[\frac{15^2}{43}+\frac{33^2}{71}+...+\frac{1^2}{30}\right]\right\}/(253-6)=0{,}173 \quad (2.13)$$

$$K = \{ 253 - (43^2 + 71^2 + ... + 30^2)/ 253\}/ 5 = 40.5 \quad (2.14)$$

$$r_H=\frac{1{,}380-0{,}173}{1{,}380+39{,}5\cdot 0{,}173}=0{,}147 \quad (2.15)$$

С поправкой на независимую от частоты корреляцию (r_{HK}):

$$r_{HK}=r_{H,01}\cdot\frac{p(1-p)}{z^2} \quad (2.16)$$

для $p = 0{,}269$, $z = 0{,}385$

$$r_{HK}=0{,}147\cdot\frac{0{,}269(1-0{,}269)}{0{,}385^2}=0{,}191 \quad (2.17)$$

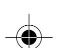
Таким образом, если встречалось больше животных с аномалиями, то r_i менялось. Это можно скорректировать путем перехода на модель постоянного исходного распределения ответственности, при

которой воздействие превышает определенное пороговое значение. *Внутриклассовую корреляцию* на шкале [0,1 $r_{H,01}$] можно обратить в корреляцию на непрерывной шкале следующим образом:

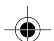
$$r_{HK} = r_{H,01} \cdot \frac{p(1-p)}{z^2}\ , \qquad (2.18)$$

где $p = \sum r_i / N$ является общей частотой особей с аномалией, а z – ординатой на стандартизированной кривой нормального распределения, соответствующей вероятности *p*. Приблизительные стандартные погрешности r_H как для непрерывных, так и для дискретных переменных вычисляются по приведенным формулам, а в табл. 2.3 даны количественные различия между линиями.

В природе генетическую основу отбора составляет избирательное участие отдельных генотипов в передаче генов потомству популяции за счет их избирательного воспроизведения или выживаемости. Для этих условий, а в отдельных случаях и для оценки инбредной депрессии, разработана *логистическая модель*, согласно которой численность зависит от максимально возможного в данной среде количества особей N_{max}



$$N_t = \frac{N_{\max}}{1 + C_0 \exp(-r(t - t_0))}, \qquad (2.19)$$



где величина $C_0 = (N_{max} - N_0)/N_0$ отражает ограничение дальнейшего роста популяции вследствие инбредной депрессии (рис. 2.4).

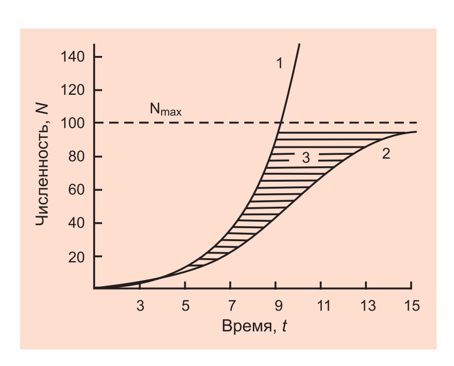
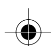


Рис. 2.4. Экспоненциальная (1) и логистическая (2) модели роста популяции; 3 – факторы инбредной депрессии. Параметры моделей: N_0 = 1, N_{max} = 100, r = 0,5

Ограничение роста популяции определяется многими факторами: наличием зоны обитания, ограничениями пищевой цепочки, накоплением ошибок в мутациях [2, 5, 13]. С точки зрения логистической модели это не принципиально. Важно лишь то, что они хорошо описываются предложенной моделью и удобны для прогнозирования при конструировании *инбредных*, *трансгенных* или *нокаутных линий* животных.

Конгенные линии как модели для этнофармакогеномики

В генетике появились самостоятельные направления: структурная, функциональная, компьютерная и этническая геномика. *Структурная геномика* изучает нуклеотидные последовательности ДНК, строение межгенных участков, обеспечивающих регуляторные функции ДНК, строение и локализацию генов, определяет их границы. *Функциональная геномика* идентифицирует функции отдельных участков генома, в том числе и структурных генов, и механизмы их взаимодействия в клетках. *Этническая геномика* изучает особенности геномного полиморфизма отдельных популяций, рас, народностей. С этнической геномикой связана *протеомика*, изучающая функционирование белков в клетках, в том числе на основе современных компьютерных технологий, – *компьютерная геномика*, которая оперирует огромными базами данных. Этническая геномика отчасти выросла из изучения *инбредных* и *коизогенных* линий животных, но в свою очередь дала толчок развитию современных представлений о конгенности и *конгенно-резистентности* лабораторных животных.




Хотя каждый инбредный штамм обладает собственным уникальным набором характеристик, для многих экспериментов нужен только хороший, стандартный и воспроизводимый, легкодоступный экспериментальный материал. Некоторые более общие «общецелевые» штаммы, например C57BL, CBA, BALB/c и C3H в случае мышей и F344, LEW и PVG в случае крыс, идеальны для таких экспериментов. Однако необходимо помнить, что, с одной стороны, экспериментальные результаты, полученные от единичного инбредного штамма, не могут обобщаться применительно ко всем особям, но, с другой – могут представлять удобную биомодель для исследований *этнических особенностей* в человеческой популяции. Там же, где необходима широкая применимость, следует использовать несколько штаммов. Хотя *аутбредный материал* также представляет собой уникальное собрание генотипов, ничто не свидетельствует о том, что такой единичный материал представляет особи в целом с большей представительностью, чем единичный *инбредный штамм*.

NB! Для повышения общеприменимости результатов исследований использовать единичный аутбредный материал невозможно.

Джон Дефрис [25] из университета штата Колорадо, занимающийся поведенческой генетикой, при помощи селекции вывел несколько десятков поколений мышей, прежде чем ему удалось получить породу конгенных животных с темной шерстью, которые были в 30 раз сме-

лее своих белых сородичей. Хотя может оказаться, что варианты генов, управляющих тревожностью мышей, отличаются от соответствующих генов человека, открытия Дефриса помогут в изучении генетических факторов, влияющих на возникновение человеческого страха. Возможно, это приведет к появлению новых инновационных анксиолитических препаратов, которые будут дифференцироваться в соответствии с запросами этнической фармакогенетики.

Если ДНК поражена и не поддается восстановлению, клетки выходят из-под генетического контроля организма и образовывают опухоли (причиной повреждений ДНК могут быть вирусы, химическое воздействие или радиационное облучение). Основная проблема лечения заключается в предупреждении метастазов. Методы лечения включают пока хирургическое вмешательство, химиотерапию и облучение, хотя современные лекарства способны отчасти сдерживать рост кровеносных сосудов в существующих опухолях, а современные вакцины улучшают сопротивляемость иммунной системы раку.




Поэтому перспективные исследования и биомоделирование ориентированы на системы ранней диагностики рака. Ученые исходят из того, что белковые или генетические модификации на поверхности раковых клеток могут служить *биомаркерами* или признаками присутствия рака в организме. Сегодня ученые всего мира занимаются изучением сотен белковых комбинаций в крови человека и животных в надежде узнать, какие из белков могут быть связаны с определенными видами рака. Как только обнаруживается такой биомаркер, ученые принимаются за создание *модифицированного* варианта этого *белка*, который и становится биомаркером. Параллельно «конструируются» адекватные трансгенные линии мышей. В *модифицированные белки* будут вводиться *токсичные вещества*. Такие белки смогут не только находить, но и уничтожать зарождающуюся опухоль сначала у *трансгенных* и *конгенных животных*, а затем и у людей [3, 16, 17, 19, 30].

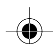
С помощью специальных генетических приемов получены многочисленные разновидности линейных мышей. К ним относятся *коизогенные* и *конгеннорезистентные* линии. Коизогенными называются генетически идентичные линии, у которых есть различия по одному локусу. Истинная *коизогенность* возможна только в случае единичной мутации в инбредной линии. Такие линии, полученные специальными генетическими методами, названы *конгенными*. Изогенное состояние достигается введением гена одной линии на генетическую основу другой линии.

Число КР-линий мышей составляет несколько сотен, и оно непрерывно увеличивается в результате получения рекомбинантных гап-

лотипов по *H-2,* ценность которых особенно велика в изучении генетической организации сложной системы *H-2.* Вторым источником получения новых КР-линий являются мутантные гаплотипы *H-2,* индуцированные или спонтанные. Известны десятки аллелей локуса *H-2K* и аллели *H-2D,* входящих в комплекс *H-2.*

NB! Конгенные линии, которые отличаются друг от друга по локусу тканевой совместимости и, следовательно, взаимно резистентны к трансплантату ткани друг друга, называются конгеннорезистентными линиями (КР), пара таких линий – КР-парой.

Конгенные линии обозначаются соединением символов двух родительских линий, разделенных точкой. Первая часть содержит полный или сокращенный символ основной линии, вторая часть может содержать полный или сокращенный символ донорской линии. Например, КР-линия B10.D2 происходит от основной линии C57BL/10-B10 и донорской DBA/2-D2. Иногда вторая часть содержит символ дифференциального локуса и его аллель $B6.C\text{-}H\text{-}2^{ba}$ или *B6-Ly-1.1.* Иногда в обозначении употребляются символы сублиний, если есть основания полагать, что сублинии отличаются: B10.DI/Ph и B10.DI/Y, например, выведены почти одновременно в разных лабораториях.




Области использования КР-линий мышей охватывают онкологию, трансплантологию, иммуногенетику, вирусологию, этническую фармакологию и токсикологию. В Центре РАМН проводятся исследования на следующих линиях мышей (поддерживается Y): A.CA(V506) (сокращенно M506), B6.C(Hz-I), B6. M505/Y, B6.C(Hz-170), B10.D2(M504)-M504, CBA.M523/Y и другие [5, 13, 15]. Достоинством конгенных линий является возможность их использования в структурной и функциональной геномике. Но наибольшую ценность они имеют в этнической фармакогенетике, а также в стремительно развивающейся *этнической фармакологии*, уже создающей инновационные лекарства для разных этносов, рас и отдельных групп народностей.

Нокаутные и трансгенные животные сегодня и завтра

Хотя в основном все медико-биологические исследования чаще выполняются на таких животных, как мыши, крысы, хомяки, кролики, но по своим биологическим и физиологическим особенностям мини-свинья ближе к человеку. Именно ее органы и ткани все чаще используют для ксенотрансплантации.

Сдерживающая проблема – иммунологическая реакция организма, которая вызывает отторжение чужой ткани или органа. Человечес-

кие антитела атакуют мишени молекул сахаров на поверхности клеток мини-свиней. Чтобы уничтожить мишени, ученые *нокаутировали* ген, который обеспечивает их образование, так называемый GGTA1 ген. Антитела лишаются мишеней, поэтому реакция отторжения блокируется [10, 13].

Следующим шагом стало клонирование генетически измененных мини-свиней и создание новой линии этих животных, которая предназначена специально для трансплантации.С ними проделали манипуляции, которые в генетике называют *нокаутом*, – попросту говоря, «выбили» из колеи. Эти гены отвечают за выработку альфа-1,3-галактозилтрансферазы (GGTA1).

NB! Через полисахарид GGTA1 запускается мощная иммунная реакция отторжения, которая препятствует успеху *ксенотрансплантологии,* то есть пересадки органов животных человеку. А если у животного GGTA1 нет – антитела человека бессильны и отторжение не происходит.




Проведенные в Каролинском институте Стокгольма клинические испытания показали, что «нокаутные» свиные панкреатические железы, введенные в человека, способны производить инсулин и годятся для лечения диабета. Есть также данные об успешных результатах лечения больных людей, страдающих болезнью Паркинсона, болезнью Хантингтона и эпилепсией. Это может быть осуществлено путем переноса им нервных клеток головного мозга от «нокаутного» эмбриона-свиньи.

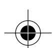
В Кембридже (Англия) ученые путем внедрения генов человека в геном свиньи вывели породу *трансгенных свиней*, генетический код которых позволяет предположить, что органы этих животных не будут отторгнуты организмом человека в случае их пересадки. Это происходит за счет *генов-регуляторов*, которые управляют иммунной системой организма реципиента человека. Первые опыты по пересадке почек трансгенных свиней обезьянам показали обнадеживающие результаты: почки нормально функционировали в организме обезьяны более двух месяцев [13, 24].

Использование более мелких животных, в частности нокаутных лабораторных мышей в качестве биомоделей наследственных болезней человека, и в трансплантологии основано либо на применении *инбридинга* – в этом случае *ценность представляет весь генотип*, который детерминирует весь комплекс биологических характеристик, либо на применении *мутантов* – в этом случае генотип не играет основную роль. Какая из моделей лучше – вопрос выбора экспериментатора.

Большая часть мутантов – спонтанного происхождения, однако существует ряд хромосомных аномалий, индуцированных радиацией

и химическими мутагенами, — *генных мутаций*. Индуцируемые этими факторами мутации происходят в любом сайте, независимо от экспериментатора. В последние десятилетия начат принципиально иной способ индукции мутаций. Индуцируются направленные мутации конкретных генов (targeted). Активно создаются три формы targeted мутации — *трансгенные, нокаутные и нокдаунные* организмы.

Трансгенные организмы несут сегмент чужой ДНК, который введен в геном путем *гомологичной рекомбинации*, вставкой инфекционным агентом — ретровирусным вектором или *негомологичной вставкой* (микроиньекцией в пронуклеус). В 2004 году Центром РАМН получены трансгенные мыши B6-Tg N(ACT в EGFP) 10 Sb, несущие ген green fluorescent protein, т.е. имеющие зеленое свечение в ультрафиолете. В настоящее время в Центре выведены новые линии трансгенных мышей B10.GFP и B10.CW.GFP, несущие ген зеленого белка, и ведется работа по созданию на принципах нокаута и нокдауна генов специализированных линий мышей.



NB! *Нокаутные формы* получают микроинъекцией генетически измененных эмбриональных *стволовых клеток* в бластоцисту хозяина. Разрушение, замещение или удвоение гена в стволовых клетках производят путем гомологичной рекомбинации между экзогенной ДНК и эндогенным геном, например, блокирование работы целевого гена встройкой гена резистентности.



Большая часть нокаутных линий создана для экспериментальной онкологии и иммунологии. В JAX лаборатории поддерживается более 300 нокаутных линий. В нашей стране, в том числе и Центре РАМН, их десятки [1, 5, 13, 19].

Методы направленного мутагенеза распространяются на самые различные макроорганизмы: от мышей до свиней и обезьян. Из литературы известно, что планируется инактивировать ген лактоглобулина у коров, чтобы молоко было не аллергенным. Ряд компаний (в целях защиты от биотерроризма) пытаются вывести и затем клонировать коров с человеческими генами для производства антител человека к токсину ботулизма.

В работе [19], наряду с традиционными линиями мышей на основе C57BL/6, используются мыши-нокауты по молекулам β_2-микроглобулина — C57BL/6J-B2m^{tmiUnc}(H-2^{b}), транспортеров, ассоциированных с процессингом (TAP) — C57BL/6J-TapI^{tmIArp}, α-цепи ECK — C57BL/6J-TCR6^{tmIMom} (H-2^{b}), CD4 — B6.129S2-Cd4^{tmIMak}, CD8 — B6.129S2-Cd8a^{tmIMak},CD400-0B6.129P2-Tnfrsf5^{tmIKik}. С их помощью получены принципиально новые данные в области иммуноонкологии и иммунофармакологии.

Так, одним из ранних проявлений иммунного ответа мышей на клетки аллогенных опухолей является накопление клеток с повышенной гранулярностью в селезенке. Их появление может быть обнаружено на следующий день после иммунизации и достигает пика на 5-6-й день. Эти клетки не экспрессируют маркеры Т- и В-лимфоцитов, макрофагов, естественных киллеров и дендритных клеток [23, 30]. Они экспрессируют CD11b (Mac-1) и Gr-1 (Ly6G) b и по морфологии являются нейтрофилами. Отсутствие экспрессии CD31 (PECAM-1) указывает на их активированное состояние, возникшее в процессе воспалительного ответа и проникновение в ткани. У мышей, имеющих дефекты развития клеток CD^8+, ответ нейтрофилов на иммунизацию клетками аллогенных опухолей существенно подавлен. Он полностью отсутствует у генетических нокаутов по α-цепи Т-клеточного рецептора (TCR). У нокаутов по CD4 и CD40 интенсивность ответа сопоставима с ответом животных дикого типа, что указывает на его независимость от Е-хелперов $CD4^+$ и активации профессиональных антигенпрезентирующих клеток реципиента.




Таким образом, у трансгенных животных и у животных с нокаутом в генах удается выявить принципиально новые эффекты и расшифровать механизмы формирования и течения воспалительного ответа, реакций при трансплантации и в целом точнее представлять себе формирование иммунных реакций и процессов методом обеспечения генетической качественности лабораторных животных, как наиболее адекватных животных-моделей. Возможности направленного получения трансгенных и нокаутных линий под совершенно конкретные задачи неожиданно быстро переносят нас в будущее фармакологии: осуществление поиска инновационных лекарств.

Гибридные и рандомбредные линии – базис экспертных и контрольных испытаний

Многие исследователи справедливо отдают предпочтение животным-гибридам F1: они широко используются в биологических и медицинских исследованиях, особенно в экспериментах по фармакологии, токсикологии, физиологии, трансплантологии, иммунологии, микробиологии, вирусологии, онкологии, радиологии, а гибриды КР-линий – в иммуногенетике. Гибриды F1 незаменимы при проведении подтверждающих экспериментов, выполнении контрольно-экспертных процедур при оценке качества лекарств и иммунобиологических препаратов, нормировании факторов окружающей среды, оценке *нелетальных воздействий. Гибриды первого поколения* (F1) являются потом-

ками от скрещивания двух высокоинбредных линий. Поэтому они генетически однородны, как и животные инбредной линии, но гетерозиготны по тем парам генов, по которым отличаются друг от друга две скрещиваемые линии.

NB! Огромным преимуществом гибридов F1 является их *фенотипическая однородность*, большая устойчивость к изменениям внешней среды, чем у животных инбредной линии, обладающих пониженной плодовитостью и жизнеспособностью.

Гибриды F1 наследуют генетические особенности родительских линий, но не сохраняют всех характеристик. Ответ их организма на экспериментальные воздействия *однотипный* и *стабильный*. Воспроизводимость результатов исследований, выполненных на гибридах F1, такая же высокая, как и у инбредных животных. Гибриды F1 не могут быть использованы для размножения, поскольку у потомков F2 будет генетическое расщепление.

Тетрагибриды – потомки животных, полученных от скрещивания гибридов F1 инбредных линий. Исходным материалом тетрагибридов являются четыре инбредные линии, которые постоянно поддерживаются для получения тетрагибридов. Тетрагибриды представляют гетерогенную популяцию, которая по генетической структуре близка к




рандомбредным или неинбредным животным. Тетрагибриды сложнее получить, чем рандомбредных мышей, так как для этого нужно поддерживать четыре инбредные линии, однако они обладают некоторыми преимуществами.

Определенная гибридная комбинация может быть получена в любой лаборатории, располагающей исходными линиями, в то время как любая выборка из рандомбредной колонии не может быть воспроизведена повторно и, будучи использована для племенных целей, даст начало колонии, отличающейся от исходной. Причем, чем меньше взята рандомбредная выборка, тем больше различий можно ожидать.

NB! Достоинством тетрагибридов является возможность лучшего генетического контроля и достижения генетической гетерогенности животных в эксперименте, так как для их получения могут быть использованы линии с известной специфичностью в отношении изучаемого признака.

В Центре РАМН предложена комбинация тетрагибридов мышей из четырех инбредных линий, имеющих белую окраску шерсти [4, 5, 12, 13]. В качестве иллюстрации приведем пример получения в лаборатории биомедицины новой линии тетра-гибридов мини-свиней. На основе гибридов от скрещивания ландрасской породы и вьетнамской вислобрюхой свиньи, для снижения инбридинга и повышения уровня

изменчивости проводилось скрещивание дигибридов LV с геттингенской мини-свиньей /g/, завезенной из ФРГ. Полученные тригибриды LVg использовались для разведения и для скрещивания с другой тригибридной формой, несущей в себе гены дикого кабана LVS. В результате такого воспроизводительного скрещивания явилось создание сложного тетрагибрида с генами LVgS. Такое сочетание генов давало возможность предположить, что при их разведении в себе (инбридинге) выявится большой диапазон изменчивости, что необходимо для проведения отбора [10, 11]. Так это и произошло.

В Центре РАМН популяции неинбредных лабораторных грызунов отвечают всем международным требованиям. В частности, это колонии морских свинок, крыс и мышей в филиале «Андреевка» (*Kv*), крыс, сирийских хомяков, мышей и кроликов в филиале "Столбовая" (*STO*). Необходимым условием сохранения биологических особенностей нелинейных животных и воспроизводимости результатов экспериментов является поддержание гетерозиготности при сохранении стабильности генетической структуры колонии. Выполнение этого условия обеспечивается при разведении животных по определенной системе, обеспечивающей рандомизацию скрещиваний. *Стандартными* могут считаться животные из закрытых колоний, размножаемых по ротационной системе на протяжении не менее четырех поколений при потере гетерозиготности менее 1% на поколение. Для обозначения стандартных неинбредных колоний (их предложено обозначать термином «*сток*») используют буквенные символы сток Lac: LACA, например, обозначает колонию мышей, поддерживаемую в английском центре лабораторных животных, а LACY – в российском Центре РАМН.



В медико-биологических исследованиях, однако, значительно чаще используются менее крупные животные: кролики, морские свинки, крысы, мыши, хомяки. В их ряду имеются гибриды F1, рандомбредные и аутбредные штаммы.

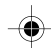
NB! Гомозиготность и генетическая однородность животных дает возможность воспроизвести эксперимент многократно и в любой лаборатории мира с одним и тем же результатом.

Это повышает надежность медико-биологических исследований. Но есть и сложности. Они, как не странно, множатся с увеличением количества новых штаммов животных по принципу «больше штаммов – труднее выбор». Правильность и обоснованность выбора адекватной биомодели может быть достигнута лишь в комплексе специалистов по генетике лабораторных животных, с одной стороны, и экспериментаторов и искателей – с другой. Во всяком случае используемые в экспертных и контрольных исследованиях аутбредные или рандомб-

редные животные зачастую сильно уступают гибридным линиям по достоверности и доказательности полученных результатов и их воспроизводимости.

Генетический прогноз и гены-таймеры

Ряд качеств инбредных, нокаутных и трансгенных животных делает их уникальным инструментом биомоделирования, биомедицинских и фармакологических исследований. Инбредные животные гомозиготны и генетически однородны, что обеспечивает получение на них надежных и воспроизводимых результатов. Новые направления – *гибридомная технология* и создание трансгенных животных – также основаны на использовании мышей инбредных стандартных линий. Инбредные мыши используются при тестировании лекарственных препаратов, химических соединений на мутагенность и канцерогенность и при построении моделей, наряду с *in vitro*-моделями [1, 15].




В нашем Центре РАМН предпринята попытка создания модели периодически меняющегося прогнозируемого ответа на мутагенные воздействия у мышей CBA/LacY в ряду поколений инбридинга [16]. Для тестирования химических мутагенов исследован и выделен ряд линий, отобраны несколько линий с различными характеристиками и чувствительностью к мутагенам. Среди этих линий CBA/LacY (CBA) была выбрана как нормальная устойчивая линия по результатам опытов с тиоТЭФ и другими мутагенами. Было обнаружено резкое достоверное повышение чувствительности мышей CBA к кластогенному эффекту *тиоТЭФ,* а также случаи не воспроизведения результатов. Изучение этого явления привело к заключению о существовании генетически детерминированных колебаний нормы реакции организма в ряду поколений инбридинга.

NB! Существуют *генетические системы* или *гены-таймеры*, которые от поколения к поколению меняют с определенным ритмом активность генома, плодовитость, реакции особей [13, 16] и их жизненные циклы.

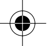
Эта задача требует длительного разведения, однако в итоге возможно создание двух колоний одновременно существующих *изогенных* мышей с резко различающейся чувствительностью к мутагену. Они могли бы стать объектами для начала исследования *генетических факторов*, периодически меняющих *норму реакций организма, плодовитость* и, вероятно, *продолжительность жизни.*

Когда были получены два поколения: в «быстрой» сублинии (на племя используются мышата первого помета) и «медленной» субли-

нии (размножение до конца репродуктивного периода) – F146 и F142 соответственно, разводимые одновременно и достоверно различающиеся по чувствительности к тиоТЭФ, было выполнено исследование их чувствительности к кластогенному эффекту классического канцерогена *бензпирена*.

Оценена чувствительность к тиоТЭФ мышей 19 последовательных поколений, размножаемых с возможно более быстрой сменой поколений («быстрая» сублиния). Кривая колебаний признака согласуется с ранее полученными данными и предложенной гипотезой, объясняющей эти колебания. При среднем значении 30% клеток с индуцированными аберрациями хромосом частота колебаний варьировала от 20 до 40%. Минимальные и максимальные значения достоверно отличаются не только друг от друга, но и от среднего уровня (при используемых выборках различия достоверны при разнице более 5%).

На основе выровненной кривой колебаний признака статистическим методом, предназначенным для анализа периодических функций (циклические изменения численности популяции и т.д.), доказана периодичность колебаний и полное соответствие данным, полученным при исследовании колебаний плодовитости мышей. Циклические колебания идут с тем же ритмом: 4,3±0,3 F поколения инбридинга на период цикла.



Чувствительность мышей «медленной» сублинии, прошедшей с начала раздельного разведения двух сублиний четыре поколения инбридинга, соответствовала ожидаемой на основе оценки признака у мышей «быстрой» сублинии. Оценены эффекты тиоТЭФ и бензпирен у мышей F142 («медленная» сублиния) и F146 («быстрая»), разводимых одновременно. Мыши поколения F146 высокочувствительны к тиоТЭФ, мыши F142 находились на среднем «нормальном» уровне, различия между ними достоверны при $P < 0{,}001$.

Результаты исследований хорошо согласуются с ранее полученными данными и предложенной гипотезой о генетической детерминированности наблюдаемых колебаний анализируемых признаков (плодовитость, *норма реакций*).

NB! Колебания чувствительности к мутагену в ряду поколений выглядят как регулярный с определенным ритмом процесс, не зависящий от средовых воздействий и контролируемый геномом. Следовательно, существуют *гены-таймеры*, которые меняют активность генома и реакции организма от поколения к поколению.

Вероятно, эти гены функционируют под влиянием информации об активности *генома предыдущего поколения* с использованием процесса *генетического импринтинга*. Это предположение согласуется с



гипотезами о природе и биологической цели генетического импринтинга [4, 5, 8].

NB! Модель существования функционирующих во времени *генетических часов* предполагает наличие каких-то единиц измерения. Наиболее вероятно, что это – циклы деления половых клеток.

Трансформированные культуры клеток прекращают существование после определенного числа делений. Поскольку предшественники мужских половых клеток делятся непрерывно, то норма реакции потомков должна меняться в зависимости от возраста родителей и номера помета. Из этого следует, что установленный ритм колебаний плодовитости и нормы реакции (4,3±0,3F) характерен для принятого в Центре РАМН и филиале «Столбовая» комплектования следующего поколения в племенном ядре из мышей 2-3-го пометов. Можно ожидать изменения ритма при ином выборе (1-го или 6-го пометов) и построить прогностическую модель [1, 13].

Полученные данные позволяют надеяться на перспективность исследования обнаруженных закономерностей. В опытах на линиях дрозофилы установлено, что колебания *плодовитости, радиочувствительности и продолжительности жизни* в ряду поколений *коррелированы*. Изучение гипотетических генов-таймеров может дать полезную информацию для оптимизации качества и продолжительности жизни человека.




Интересна в этом отношении гипотеза о возможной регуляции видоспецифическими *генами-таймерами* скорости процесса старения. С другой стороны, эти данные практически полезны для планирования и организации экспериментов с использованием инбредных мышей, интерпретации полученных результатов и построения оптимизированных моделей для фармакологии и токсикологии.

О важности генетической характеризации

Генетические исследования на животных дают возможность для скрещивания и отбора, контроля условий среды, в которых развивается потомство, при отсутствии этических преград для проведения любых манипуляций на всех уровнях функционирования: от геномного до популяционного. У человека и животных гораздо больше общности, чем различий, например, число нуклеотидов в ДНК человека и мыши составляет примерно три миллиарда, из которых 99% генов являются общими. Эксперименты на животных, как на более простых системах, позволяющих к тому же осуществлять вмешательство в деятельность этих систем, позволяют подойти к решению некоторых

проблем генетики деятельности человека. Во всех случаях необходим качественный *генетический мониторинг* животных-моделей для соблюдения «чистоты» экспериментов.

Характеризация – проводится для подтверждения генотипа инбредных, трансгенных и нокаутных линий и для создания генотипа новых линий путем проверки возможно большего числа локусов.

Не вызывает сомнения тот факт, что «*генетическое заражение*» нарушит чистоту линии животных и достоверность результатов эксперимента. Генетический контроль не может предотвратить «генетического заражения», но от этого он становится еще более важным.

Мониторинг I – проводится с целью подтверждения генетического профиля.




В генетическом контроле локусов показатели, позволяющие выделять животных в отдельную лабораторную линию, называются *маркерами*. В соответствии с их биологическими функциями маркеры делятся на 6 групп: *биохимические*, *морфологические*, *иммуногенетические*, *молекулярногенетические*, *фармакогенетические* и *цитогенетические*. Для избрания локусов в качестве маркеров для генетического анализа их обнаружение должно быть точным, простым в исполнении, эффективным и экономичным. Из 6 групп наиболее подходящие маркеры были найдены в биохимической и иммуногенетической группе, поскольку количество локусов в них известно лучше, чем в других маркерах, и их обнаружение проще в осуществлении [1, 13].

Для работы достаточно 19 маркеров: 15 биохимических и 4 иммуногенетических. Предложена следующая схема генетического контроля. Каждая линия сразу после внедрения должна пройти характеризацию в целях подтверждения генотипа. Если внедряемая линия соответствует ожидаемым характеристикам, она периодически (раз в год) подвергается *мониторингу I*. Через несколько лет после внедрения вновь проводят процедуру характеризации.

Мониторинг II – проводится для подтверждения критических подгрупп, которые представляют собой минимальный набор отдельных локусов, позволяющих выделять данную группу животных в обособленную линию.

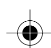
Мониторинг II проводится по необходимости. Эффективным механизмом контроля является сверка критических подгрупп. Критические подгруппы представляют собой ряд локусов, строго отобранных из генетических профилей ограниченных инбредных линий. Например, 5 наиболее часто встречающихся инбредных линий (AKR, C3H/He, DBA/2, BALB/c и C57BL/6) можно распознать, используя 4 биохимических маркера (Hbb, Car-2, Gpi-1, Idh-1). Количество маркеров

критических подгрупп зависит от количества проверяемых линий, но обычно оно не больше пяти.

Фармакогенетическое мониторирование может быть проиллюстрировано следующими примерами. Нами изучались различия между линейными животными по обучению *условной реакции активного избегания* (УРАИ) и влияния на них различных психотропных средств. В исследовании были использованы две линии крыс: линия WAG/GSto, более известная как Wistar albino Glaxo, генотип *a*, *c*, инбридинг 137, и линия WKY/N (синоним Kyoto-Wistar), генотип *c*, аутбредный сток крыс Wistar. Отличие этих линий заключается в том, что степень инбридинга WKY/N точно неизвестна, поэтому для ее обозначения больше подходит термин «*сток*».

NB! УРАИ является удобной фармакогенетической моделью для изучения действия психотропных средств. Она позволяет оценить влияние исследуемого вещества на обучение и память и выявить *стресс-протективную активность* химических соединений.

Совокупность данных об изменении нейрохимических, электрофизиологических и морфологических показателей при формировании УРАИ позволяет квалифицировать состояние животных и их генетические особенности [8, 14].




Существует несколько вариантов УРАИ, которые обусловлены степенью экстремальности этого состояния в зависимости от условий их выработки. Одним из наиболее часто используемых вариантов является УРАИ в челночной камере. Процедура выработки состоит в смене животным одного из двух отделений камеры по условному сигналу (зуммер в течение 5 с). При невыполнении перехода в противоположный отсек животное получает электроболевое раздражение лап.

Схема эксперимента, при которой задаются стабильные интервалы между условным и безусловным раздражителем и между парой сочетаний при общей длительности опыта от 5 до 11 дней (от 10 до 30 сочетаний в день), наиболее часто используется в исследовании влияния веществ на обучение, консолидацию, воспроизведение и долговременность памяти. В данном случае экстремальность ситуации относительно низка, так как постоянство временных диапазонов между стимулами способствует относительно быстрой *адаптации животного* к такому стрессирующему фактору, как ожидание боли в ответ на условный сигнал.

Второй вариант (в нашей модификации) выработки УРАИ в челночной камере заключается в том, что наблюдение проводится в течение одного дня с применением 50-100 сочетаний условного и безусловного стимулов со случайным характером интервалов. При использовании такого методического приема эмоциональное напряже-

ние у животных значительно сильнее, чем при первом варианте, так как оно обусловлено большей длительностью экстремального воздействия (1,5-2 ч), а также неопределенностью получения *аверсивного раздражения*.

Положительное влияние психотропных средств на обучение навыку избегания в условиях эмоционального стресса, который проявляется в статистически значимом увеличении числа правильно выполненных побежек, по своевременным представлениям расценивается как один из способов адаптации к *эмоционально-стрессовой* ситуации.

NB! Ускорение обучения под действием препарата, равно как и исходно высокая обучаемость у интактных животных, является генетически предопределенным способом адаптивного преодоления действия стрессора, каковым и служит ситуация в челночной камере.

Нами исследованы препараты всех фармакологических групп психотропных средств на разных животных, но здесь мы коснемся в большей степени сравнительного влияния антидепрессантов и нейролептиков на крыс линий WAG/G и WKY/N. В отличие от транквилизаторов влияние нейролептиков на выработку УРАИ обусловлено не только их воздействием на систему отрицательного подкрепления, но и нарушением условнорефлекторной деятельности.




Нами был выявлен угнетающий эффект транквилизатора мебикара (500 мг/мл) и диазепама (2 мг/кг) на выработку УРАИ у крыс линии WAG/G при проведении многодневного эксперимента (10 дней) с ежедневным использованием 10 сочетаний условного и безусловного сигналов. При данной схеме проведения эксперимента достоверное уменьшение числа правильных побежек при действии мебикара отмечалось на 5-8-й день обучения, а при действии диазепама – на 7-10-й день (рис. 2.5). Характерно, что у крыс линии WKY/N эти изменения мало отличались от контроля.

Представлялось интересным проанализировать способность трициклических антидепрессантов оказывать различное влияние на процессы психической адаптации в условиях применяемой нами модификации УРАИ. Для экспериментального подтверждения адекватности данного препарата УРАИ мы предприняли попытку установить дозу имипрамина, подавляющую выработку УРАИ. Оказалось, что этим свойством препарат обладал у крыс WAG/G, уже начиная с дозы 0,1 мг/кг. Влияние дозы имипрамина 0,5 мг/кг характеризовалось предельно низким по сравнению с контролем числом правильных побежек (9,33±5,98 против 32,0±1,08). Характерно, что, нарушая выработку УРАИ, имипрамин в данной дозе не нарушал эмоционального восприятия звукового сигнала. Об этом свидетельствовала напряженная поза животного после

предъявления зуммера, характерная для состояния ожидания аверсивного стимула.

Данный факт свидетельствует в пользу того, что используемая доза имипрамина является, по-видимому, пороговой по влиянию на эффекторные механизмы функциональной системы адаптивного поведения, так как она не нарушает афферентного синтеза. Эффект имипрамина в дозе 0,1-0,5 мг/кг существенно отличается от такового при действии на выработку УРАИ диазепама (10 мг/кг), фенибута (50-100 мг/кг), оротата калия (100 мг/кг), галоперидола (0,1 мг/кг) [14], которые нарушают выработку УРАИ за счет угнетения системы отрицательного подкрепления. Поиск доз трициклических антидепрессантов, которые способствовали бы ускорению выработки реакции избегания, позволил установить, что имипрамин обладает этим типом действия в дозе 0,02 мг/кг, иприндол — в дозе 0,02 мг/кг, амитриптилин — в дозе 0,1 мг/кг. Эти изменения хорошо прослеживались на крысах WAG/G, но не на линиях WKY/N (рис. 2.5).

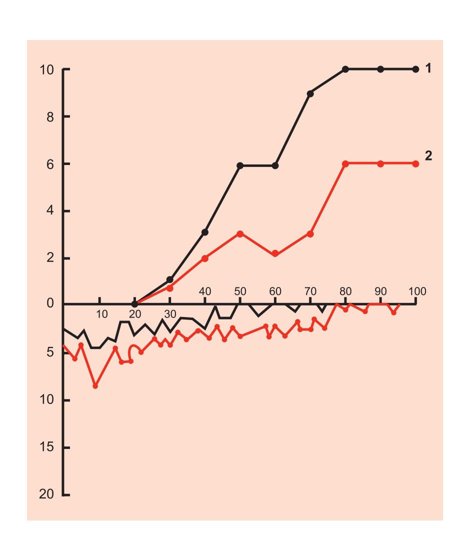
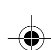
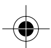


Рис. 2.5. Влияние имипрамина на выработку УРАИ. По абсциссе – порядковые номера сочетаний; по ординате: верхний квадрант – количество переходов на условный сигнал (сумма в каждом десятке сочетаний) – рефлекс избегания болевых раздражений, нижний квадрант – латентные периоды перехода на болевые раздражители (сумма в каждых двух сочетаниях), рефлекс избавления от болевых раздражений (в секундах); 1 –крысы линии WAG/G Sto; 2 –крысы линии WKY/N



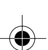


Примененный нами вариант УРАИ позволяет не только получить интегральные характеристики выработки оборонительного рефлекса (общее число правильно выполненных реакций), но и исследовать динамику выработки во времени. Это дает возможность более детально оценивать ход выработки реакции. Рисунок 2.5 наглядно иллюстрирует, что стимулирующее влияние имипрамина в дозе 0,02 мг/кг на выработку УРАИ проявляется только после предъявления животным 40-50 сочетаний условного и безусловного раздражителей.

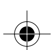
Анализ динамики обучения на линиях WAG/G и WKY/N позволил нам установить наличие стимулирующего действия на УРАИ галоперидола. Исследование влияния малых доз препарата (0,05, 0,1, 0,5 мг/кг) не

обнаружило заметных сдвигов в общем числе правильных реакций, хотя при дозе 0,01 мг/кг отмечалась некоторая тенденция (39±4 против 32±1,08 в контроле). Обращало на себя внимание изменение поведения крыс WAG/G, свидетельствующее о значительном улучшении восприятия ситуации выработки УРАИ в отличие от их поведения при действии дозы 0,1 мг/кг, полностью подавляющей выработку навыка.

Анализ показал, что стимулирующее действие галоперидола в отличие от аналогичного действия амитриптилина и имипрамина проявляется на поздних этапах обучения и достоверно превышает показатели контроля на высоте 800-100 сочетаний (рис. 2.6). Испытания при помощи используемого нами способа выработки УРАИ в ответ на атипичный нейролептик эглонил также обнаружили у него стимулирующий УРАИ компонент, действие которого проявляется при дозе 10 мг/кг. В отличие от галоперидола эглонил обладал выраженным стимулирующим влиянием и на крыс WKY/N, которое достаточно четко проявилось уже с 50-го сочетания.



Таким образом, не только антидепрессанты, но и нейролептики обладают двумя типами действия на выработку УРАИ, причем первый активирующий тип действия может быть обусловлен оптимизацией интрацентральных отношений головного мозга, что облегчает процесс восприятия информации и ускоряет приобретение полезного навыка в отношении крыс WAG/G, но не WKY/N. По этому показателю адаптогенного действия исследованные нами препараты (имипрамин, амитриптилин) приближаются к психостимулятору фенамину (доза 0,5-1 мг/кг), а также к транквилизаторам фенибуту (0,5-5 мг/кг) и диазепаму (0,1 мг/кг). В пороговых дозах, угнетающих выработку УРАИ (галоперидол – 0,1 мг/кг и более, амитриптилин – 15-30 мг/кг, имипрамин – 0,1 мг/кг и более, фенибут – 100 мг/кг, диазепам – 10 мг/кг, эглонил – 20 мг/кг и более, иприндол – 0,1 мг/кг и более), препараты в большинстве случаев угнетали как ориентировочно-исследовательскую, так и спонтанную двигательную активность. В указанных дозах препараты резко ослабляли



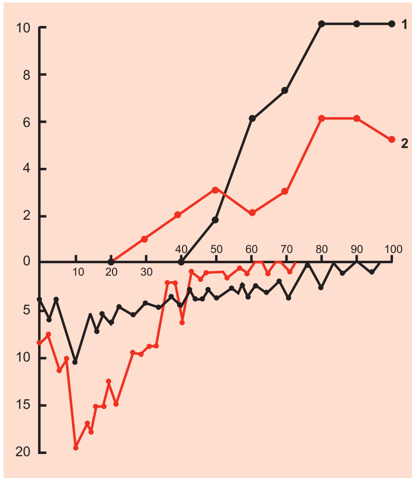


Рис. 2.6. Влияние галоперидола на выработку УРАИ (обозначения те же, что и на рис. 2.5)

или блокировали реакцию на звуковой сигнал (галоперидол, иприндол) или нарушали сам процесс активного избегания (имипрамин).

NB! Исследования действия психотропных препаратов на УРАИ свидетельствуют о наличии двух биологически целесообразных типов адаптогенного действия, иллюстрирующих фармакогенетические различия действия антидепрессантов, транквилизаторов, классических и атипичных нейролептиков, а также их дозозависимые эффекты.

В данном случае для нас существенно важны различия в реагировании на психотропные средства разных линий животных. Так, крысы линии WAG/G в большей степени соответствуют человеку по характеру метаболических процессов, в частности по биотрансформации этилморфина и анилина, способности к индукции редуктазы НАДФ-цитохрома С и другим показателям в сравнении с аутбредными крысами и линией WKY/N. Этим примером мы хотели еще раз подчеркнуть важность генетического мониторинга и выбора адекватных животных-моделей для получения качественных экспериментальных данных.

В качестве примера влияния на поведение не только генетических, но и *средовых факторов* мы воспользовались данными других авторов [36, 40]. Детенышей каждой из линий — «умной» и «глупой» — были разбиты на 3 группы. Крысята первой группы выращивались в обычных условиях. Детеныши из второй группы с момента рождения были лишены тех факторов среды, которые способствуют познавательной или исследовательской деятельности, т.е. росли в условиях *депривации*. Третья группа крысят, наоборот, была помещена в сенсорно «обогащенную» среду — внутри клетки находились трапы, зеркала, туннели и другие приспособления, способствующие развитию разнообразных видов активности.



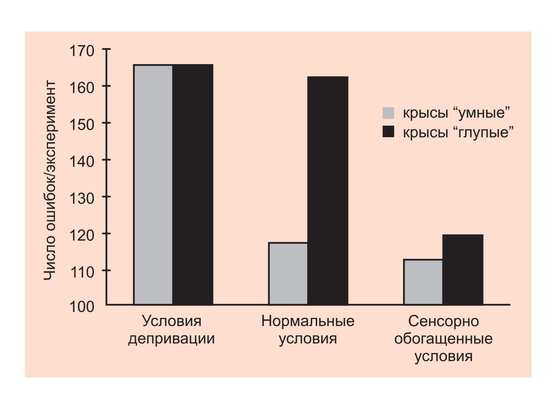



Рис. 2.7. Результаты обучения в лабиринте «умных» и «глупых» крыс, выросших в различных условиях

Показано, что *межлинейные различия* в этой ситуации наблюдались только в группах животных, выращиваемых в обычных условиях. Депривированные животные разных линий одинаково плохо справлялись с лабиринтом, а вот животные, росшие в сенсорно-обогащенной среде, независимо от принадлежности к линии, по-

чти одинаково хорошо обучались поведению в лабиринте (рис. 2.7). Из этого опыта следует, что депривация в раннем возрасте отрицательно сказывается на способности к обучению в дальнейшем, и, наоборот, сенсорно-обогащенная среда может улучшить эту способность, несмотря на существующие генетические различия.

Таким образом, генетические различия могут проявляться или не проявляться в фенотипе при изменении среды обитания. Но не учитывать их нельзя, поскольку от этого зависит качество и даже характер результатов исследования. Генетический контроль и мониторинг животных столь же важен для исследователя, как и все иные составляющие эксперимента, в особенности для фармакологов и токсикологов.

Изволение животных

В настоящее время в экспериментальной медицине применяют несколько сотен видов позвоночных и беспозвоночных животных. Лабораторные животные внесли неоценимый вклад в развитие науки, что было увековечено в памятниках. В мире существуют памятники и лабораторным животным – лягушке в Сорбонне, «павловской» собаке и коту в Колтушах. Есть также сообщения об «увековечивании» мушки-дрозофилы, лабораторных крыс, мышей и даже мини-свиней, которые по многим биомедицинским параметрам похожи на человека в неменьшей степени, чем он сам на себя.




Хотя ученые все чаще говорят, что в XXI веке предпочтительнее использовать *альтернативные методы* исследования, в том числе *компьютерную биологию*, животных исключить из экспериментов невозможно. Поэтому мы ниже приводим предельно сжатую информацию о животных-моделях в последовательности предпочтения использования replacement – одного из принципов 3R, основываясь на сравнительно-генетических подобиях с человеком.

NB! В подзаголовок взято старинное русское слово *изволение*, что буквально означает *воля и желание*, подчеркивающее наше стремление исключить или ограничить использование в эксперименте крупных млекопитающих, в особенности приматов.

Желание широкого использования самых разных животных должно быть подчинено *доброй воле* исследователя руководствоваться прежде всего гуманным отношением к нашим братьям меньшим.

Обезьяны

Общее название подотряда высших или человекообразных приматов, который подразделяется на надсемейства: широконосых и узконосых. Узконосые обезьяны делятся на две группы: высшие (чело-

векообразные) и низшие (собакообразные и мартышкообразные). К человекообразным обезьянам относят род гиббонов, орангутангов, шимпанзе, горилл, сростнопалов. Почти все обезьяны ведут дневной образ жизни. К мартышкообразным обезьянам относятся мартышки, макаки, павианы, гелады и другие. Из этого надсемейства в качестве лабораторных животных чаще используются *макаки-резус*.

Удалось расшифровать ДНК макаки-резуса, а также сравнить ее с ДНК человека и шимпанзе. Данные, полученные в результате расшифровки генома резуса, помогут понять, настолько ли они хороши в качестве модели человека. Команда из 170 ученых Медицинского колледжа имени Бейлора сделала попытку ответить на вопрос, чем же эти настолько похожие на нас животные отличаются от *Homo sapiens*.

Как выяснилось в ходе исследования, небольшая мутация одного гена у человека делает его восприимчивым ко многим заболеваниям, которые не страшны обезьяне. Кроме того, генетики обнаружили часть генома макак, который в точности похож на некоторые человеческие заболевания, в частности у макак обнаружен ген PKU (phenylketonuria), который может привести к повреждению головного мозга у людей и задержке в умственном развитии. Биологи также идентифицировали около 200 генов, которые служат доказательством эволюционного развития и разницы между приматами. Эти гены частично отвечают за формирование волосяного покрова, работу имунной системы, мембранных белков, а также за процесс оплодотворения яйцеклеток. Результаты данной работы способны внести огромный вклад в понимание эволюции приматов, и, возможно, даже позволят узнать, что именно делает человека человеком.



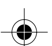

NB! Макаки отделились в ходе эволюции от общего предка современных приматов около 25 миллионов лет назад, а шимпанзе – около 6 миллионов лет назад, при этом у первых ДНК на 93% совпадает с человеческим, а у вторых – на 99%.

По своим общим характеристикам, таким, как размер, число хромосом, число генов, порядок генов в хромосомах и т.п., геном макаки не очень отличается от геномов гоминид (человека и шимпанзе). У макак, как и у нас, примерно половину генома занимают разнообразные повторы и мобильные элементы. Обнаружено около 320 000 *транспозонов*, относящихся более чем к 100 семействам, и свыше полумиллиона *ретротранспозонов* или «эндогенных» ретровирусов. Среди транспозонов ничего существенно нового не обнаружилось, а вот среди ретротранспозонов есть новые вариации, в том числе, вероятно, полученные предками макаков путем горизонтального переноса от каких-то других видов животных. Активность ретроэлементов, судя по всему,

играла важную роль в эволюционных преобразованиях генома у приматов.

Многие виды обезьян, особенно гориллы и шимпанзе занесены в Красную книгу. Однако человекообразные обезьяны используются как лабораторные животные для изучения вопросов этиологии, патогенеза и лечения многих инфекционных заболеваний, а также сердечно-сосудистой, эндокринной и опорно-двигательной систем, злокачественных новообразований и заболеваний центральной нервной системы, так как по своим анатомо-физиологическим показателям близки к человеку [33, 35]. В Великобритании, США и других странах было проведено исследование по использованию нечеловекообразных обезьян в биологических и медицинских исследованиях.

NB! Эксперты пришли к убеждению, что для использования обезьян в экспериментах зачастую нет достаточных оснований. Если их все же используют в экспериментах, то наряду с соблюдением всех условий биоэтики и этологии, необходима аргументация такой потребности.





При малейшей возможности необходимо использовать альтернативные модели [13, 22, 23], в частности почки хомяков для выращивания вирусов и получения вакцин. В последние годы в нашей стране для исследований стали все реже использовать обезьян, хотя эксперименты на них позволяют более глубоко и всесторонне изучить ряд важнейших вопросов биологии и медицины. Следует отметить, что методы разработки, оценка эффективности и безопасности вакцин таких заболеваний, как корь, полиомиелит, паротит, краснуха и др. возможны только на обезьянах. В нашем Центре макаки-резусы используются в фармакологических и иммунологических исследованиях.

Мини-свиньи

Suidae, относятся к семейству нежвачных млекопитающих отряда парнокопытных – самый новый вид лабораторных животных, который все шире используют в медико-биологических целях в нашей стране и за рубежом, хотя свиньи, как объект исследования, использовались и описаны еще в трудах Гиппократа. При создании многих линий мини-свиней как исходный вид были использованы дикие кабаны, обитающие в настоящее время.

В процессе разработки проекта «Манхеттен» по созданию американской атомной бомбы в 1943 году перед генетиками была поставлена задача по созданию линий карликовых свиней. Главным отличием лабораторных свиней от обычных является их миниатюрность, за что их называют мини-свиньями (до 20-30 кг) или миди-свиньями (50 кг и более). В нашей стране создание мини-свиней начато в 70-х годах

XX века параллельно в Новосибирском институте цитологии и генетики АН СССР и НИЛЭБМ РАМН, ныне НЦБМТ РАМН. Генофонд мини-свиней России постоянно совершенствуется [10, 11, 13].

С тех пор как ученые расшифровали и сравнили геном человека и других млекопитающих, специалисты по клонированию животных все больше предпочтения отдают мини-свиньям. За последние шесть лет разные породы этих животных успешно клонировали в Англии, США, Китае, Дании.

NB! Мини-свиньи оказались наиболее генетически близкими человеку сородичами и их органы можно использовать для пересадки людям. Полная расшифровка генома и генный нокаут мини-свиней поможет медикам бороться с такими человеческими недугами, как диабет, сердечные болезни, нервные и психические заболевания.

Ученые Иллинойского университета (США) осуществили сравнение генома свиньи и человека в 2005 году. Был выделен грант на сумму в 8,25 млн. долларов на полную расшифровку генома свиньи к 2007 г. В США, Франции и Англии добавлено еще 16,5 млн. долларов. Потребуется расшифровать 2,5 млрд. пар химических оснований, которыми записана генетическая информация (человеческий геном состоит более чем из 3 млрд. пар оснований). В открытом доступе в Интернете размещены около 4 миллионов фрагментов генома, полученных от пяти свиней из Европы и Китая. Эти фрагменты еще предстоит проанализировать и соединить в нужном порядке. Но уже сейчас исследователи говорят, что геном свиньи ближе к человеческому, чем у многих других лабораторных животных, не считая приматов. Это имеет важное значения для медицинских исследований. Работы начаты в 2001 году, а их стоимость составила около 10 млн. долларов.




Мини-свиней используют в качестве биомоделей, поскольку по ряду анатомо-физиологических показателей ближе всего стоит к человеку после обезьяны. С человеком ее роднит строение и физиология сердечно-сосудистой системы пищеварения, строение зубов, почек, кожи, глаза. Мини-свинья подвержена стрессам, имеет сходный с человеком состав крови и цифры артериального давления. Система кровообращения мини-свиньи и сердце имеют большое сходство с аналогичными человеческими органами. Показано, что у тех и других механизм подавления иммунитета после ишемии связан с образованием иммуносупрессорных веществ в сыворотке крови. На свиньях ведутся исследования по изучению гистосовместимости, исследуются иммунологические аспекты постнатального развития плода. Исследования, выполненные в Центре РАМН, свидетельствуют, что алкогольная интоксикация приводит к уменьшению у животных со-

держания Т- и В-клеток крови, заметной тенденции к усилению реакции бласттрансформации лимфоцитов. Есть также данные, что при этом происходит угнетение активности ферментов метаболизма ксенобиотиков [10, 13, 31].

На свиньях возможно моделирование вирусных заболеваний, свойственных человеку, а также целого ряда протозойных, паразитарных, вирусных и бактериальных заболеваний [31]. В радиобиологии свинью можно использовать как экспериментальное животное, заменяющее обезьяну, с целью проверки влияния на организм различных доз облучения, изучения радиопротекторов.

NB! Исследования на мини-свиньях включают консервативные и различные, в том числе микрохирургические вмешательства, особенно в челюстно-лицевой хирургии и реконструктивной стоматологии.

Свиньям возможно вживление в мозг электрокортикографических электродов, удаление гипофиза, а также различных желез: слюнных, паращитовидной, щитовидной. Для различных манипуляций в области грудной клетки проводят латеральную или срединную торакотомии с последующими необходимыми для эксперимента манипуляциями: удалением легкого, пересадкой сердца, ваготомии и т.д. Экспериментальные операции на брюшной полости включают введение канюли в желудок, наложение фистул слепой кишки и кишечника, поджелудочной железы. На этом объекте можно производить биопсию печени, удаление надпочечниковых желез, селезенки, конструировать перекрестное кровообращение и создавать портокавальные анастомозы.



Целый ряд хирургических вмешательств можно проводить и в области мочеполовой системы: пересадку зародышей, гистерэктомию, удаление яичников, кастрацию и удаление семявыносящего протока. Можно вводить канюлю в яичниковую вену, проводить кесарево сечение, вводить канюлю в мочеточник, проводить биопсию почки и микропункцию нефронов. Возможно даже создавать анастомозы между фаллопиевой трубой и подвздошной кишкой. В нашем Центре минисвиньи успешно используются для оценки биоэквивалентности лекарств, которую в других странах устанавливают исключительно на людях (добровольцах-волонтерах). Мы считаем это достаточно гуманным подходом.

NB! Наш опыт использования мини-свиней при изучении эффектов и токсичности лекарственных веществ, их фармакокинетики, биодоступности, биоэквивалентности, фармакогенетики дает основание предупредить исследователей о технологических трудностях при многократном заборе крови и проблемах ее хроматографического и масс-спектрометрического анализа ввиду естественной гиперлипидемии.



Помимо апробации антиалкогольных и антинаркотических препаратов на мини-свиньях возможно проводить доклиническое испытание новых фармакологических средств, изучать токсичность целого ряда соединений, содержащих ртуть, свинец, афлатоксины, каменноугольные смолы и др. Мини-свинья может быть использована для изучения веществ, загрязняющих воздух и отрицательно влияющих на здоровье животных или человека [9, 10, 12, 13].

Овцы

Ovis aries, домашнее жвачное млекопитающее животное, продолжительность жизни овцы при благоприятных условиях 14-15 лет. Половая зрелость наступает в 5-7 мес. Благодаря различным манипуляциям, проводившимся с этими животными *in vivo* и *in vitro*, наши представления об организации и функционировании иммунной системы значительно расширились. Проведение модельных экспериментов на овцах оказалось плодотворным при онто- и филогенетических исследованиях.




На овцах можно проводить разнообразные хирургические операции, их использование было особенно полезным при изучении иммунного и воспалительного ответа на введение антигенов и пирогенных веществ, трансплантационных реакций на пересаженные органы и ткани, влияния тимэктомии у плодов на онтогенез иммунной системы, миграции популяций лимфоцитов между сосудистой и лимфоидной системами у плодов, новорожденных и взрослых животных, а также модулирующих эффектов антигенов на процессы миграции [32].

Канюлирование лимфатических сосудов плода и тимэктомия *in utero* были использованы для изучения возникновения пула рециркулирующих лимфоцитов плода, а также роли тимуса в онтогенезе лимфоидных тканей и в развитии иммунологической компетентности. Пейеровы бляшки подвздошной и тощей кишки овцы различаются морфологически и, вероятно, функционально. Пейеровы бляшки тощей кишки содержат В-клеточные фолликулы и отчетливые Т-зависимые зоны, в то время как пейеровы бляшки подвздошной кишки связаны в основном с В-клеточным лимфопоэзом и могут частично рассматриваться как первичный орган лимфоидной системы.

NB! Гибридомные технологии получения моноклональных антител к поверхностным маркерам лимфоцитов овец позволяют более полно охарактеризовать субпопуляции, пути миграции и их функциональную роль в иммунитете не столько овец, сколько человека.

Овцы являются удобной биомоделью для исследования в различных неврологических экспериментах, нейротоксикологии и психофар-

макологии. К слову, общепринятые представления о том, что овцы являются эталоном глупости и тупости весьма далеки от реальности. Британские ученые выступили с сенсационным заявлением: бараны обладают отличной памятью и безошибочно запоминают людей. Да что там! По мнению английских ученых, их интеллектуальные способности в некоторых случаях приближаются к человеческим. Репутацию глупых они заработали потому как необычайно боязливы. Овцы, как животные-модели стали более популярными после широко разрекламированной акции клонирования овечки Долли. Наряду с вышеуказанными методами, в нашем Центре овцы используются для оценки биоэквивалентности лекарств, их фармакокинетики, а также и в других доклинических исследованиях.

Собаки

Canis familiaris, относятся к хищникам, семейству псовых (*Canidae*). Происходят они от двух диких предков – шакала (в южных странах) и волка (в северных странах). Археологические раскопки с достоверностью подтверждают, что собака была одомашнена свыше 14 тыс. лет тому назад – раньше других животных. Существует несколько сот пород собак. Собаки наиболее часто используемый вид и наиболее общий вид, используемый в токсикологии. Наиболее пригодными являются различные помеси от скрещивания нескольких пород собак.




Собака стала следующей разновидностью млекопитающих – после людей, крыс и мышей, геном которой удалось более-менее расшифровать. Американские ученые из Института исследования генома (Institute for Genomic Research) произвели на свет «грубый эскиз» анализа генов собаки. Они признают, что охватить удалось далеко не все гены собаки – около 80%, но уже стало ясно, что собаки и люди генетически ближе друг к другу, чем, например, мыши – от 18,5 до 25 тысяч генов у нас с собаками общие.

Собака подходит для воспроизведения длительных хронических опытов. Ценность собак в опытах по исследованию фармацевтических препаратов находится под пристальным вниманием на протяжении многих лет. В последнее время Международный Институт Наук о Жизни опубликовал результаты анализов, показавших, что относительно высокая пропорция токсинов для человека в клинических опытах была достаточно точно оценена в опытах на собаках. Согласованность токсичности для животных и человека во многом наиболее точна для собак, чем для грызунов [13, 32]. Линейные собаки требуют специальных условий, так как хуже переносят хронические опыты. Особенности нервной, эндокринной и сердечно-сосудистой

систем, органов пищеварения, дыхания и выделения собаки близки к таковым у человека.

NB! Собака породы *бигль* или *английский бигль* является наиболее распространенной и общепринятой линейной биомоделью для проведения стандартизованных исследований и оценки лекарств, ксенобиотиков, нормирования факторов окружающей среды, испытания медицинской техники.

Бигль принят во всех лабораториях мира как стандартная модель в физиологии, фармакологии, токсикологии, в исследованиях центральной нервной системы и высшей нервной деятельности с помощью метода условных рефлексов (выработка секреторных и двигательных временных связей) и электроэнцефалографии, для изучения функций сердечно-сосудистой системы, пищеварения, нормирования таких факторов, как ионизирующее излучение, пребывание в биоспутниках, гипоксия и т.д.





Реакции дыхания, кровообращения и других важнейших систем организма собаки при изменении условий внешней среды, а также воздействии многих фармакологических и токсических веществ приближаются к изменениям, наблюдаемым у человека. Собак используют для наложения различных фистул внутренних органов, воспроизведения различных неинфекционных заболеваний: болезни сердца и сосудов, неврозы, поражения органов желудочно-кишечного тракта и органов выделения, эндокринных заболеваний и т.д. Собаки являются хорошими моделями воспроизведения ряда инфекционных заболеваний, а щенятам легко прививают корь, коклюш, лептоспирозы, чуму собак. В Центре РАМН собаки используются в щадящих исследованиях по фармакокинетике и биоэквивалентности лекарств.

Кошки

Хищники рода *кошачьих* (*Felidae*), широко используются в разных областях биологии и медицины: для электрофизиологических и аллометрических экспериментов, для проведения острых опытов с регистрацией кровяного давления и дыхания, для определения токсичности веществ, биологической стандартизации сердечных гликозидов и для других целей. Современная кошка не имеет отношения ни к дикому лесному коту, ни к степной кошке. Ее предок – это североафриканская аравийская буланая кошка, которая жила в пустыне, питалась ящерицами и грызунами. Первыми, кому удалось приручить кошку, были египтяне, и произошло это более 4 тыс. лет назад. Из Египта кошку вывезли сначала в Индию и Китай, а уж потом в Европу.

В Средние века в Европе кошек использовали отнюдь не в медико-биологических целях и им пришлось несладко. Их (особенно черных) объявили исчадием ада и вместе с ведьмами сжигали заживо на костре. На нашей планете живут больше 400 миллионов кошек, причем значительное число их обитает в домах. В Австралии, где на каждых 10 жителей приходится по 9 кошек, издан закон, запрещающий владельцам кошек выпускать животных на улицу без ошейника и микрочипа. Кошкам без ошейника грозит уничтожение. Ничего не поделаешь, люди то гуманны, а закон жесток!

Проект «Кошачий геном» опирается на лабораторные исследования многих ученых. Он объединил знания о 37 видах кошек в единую научную базу и выделил вид *Felis catus*, представляющий домашнюю кошку. Эти поиски уже позволили установить, что у человека и кошки 200 общих генетических болезней, включая мускульную дистрофию, детский поликистоз и отслоение сетчатки глаза. Ученые нашли генетические причины, вызывающие эти нарушения у кошек, а значит, и у человека. В Национальной исследовательской лаборатории отклонений в генетике (Мэриленд, США) начали изучать гены домашней кошки в 1970 году, затем продолжили исследования на диких кошках: от львов до пум.




NB! Кошки оказали реальную помощь людям, так как их дикие сородичи имеют природное, заложенное генетически сопротивление самым распространенным недугам, свойственным человеку. Например, у домашней кошки смертельный СПИД развивается как синдром после инфицирования вирусной (ее аббревиатура FIV) инфекцией.

Этим домашняя кошка отличается ото льва, которому не угрожает этот недуг. Животные, которые справляются с вирусом, имеют специальный набор генов – CCR5, который свойственен и некоторым людям. Его имеет человек, оба родителя которого наследуют именно этот генетический код, дающий защиту от СПИДа. CCR5 – генная пара, противостоящая СПИДу, обеспечивает выработку протеинов, которые блокируют клетки смертельного вируса и изолируют их от здоровых клеток.

Кошка и человек имеют общий одинаковый набор генов – 50 000. Человек имеет 23 пары хромосом, кошка – 19 хромосомных наборов, схожесть наблюдается в 16 хромосомных наборах. Для сравнения: мышь и человек имеют совпадения лишь в одной пятой случаев. Что же объединяет кошек и людей на генетическом уровне? Обнаружено 590 функционально важных генов кошки, которые позволяют клеткам вырабатывать особые протеины, а другие 620 генетических «марке-

ров», которые выстраиваются в цепочки и выполняют функцию запасных, заполняют возникающие в цепочках бреши.

NB! Схожесть, которую две кошки имеют в десяти хромосомных маркерах и в одних и тех же хромосомных наборах, составляет лишь одну из 10 миллионов к одной из 10 триллионов, а это означает, что двух одинаковых кошек как бы не существует.

Их гены и «маркеры» включаются в хромосомные наборы и образуют защитный барьер, который ученые назвали *регулятором генов кошек*. Генетическую систему кошки очень трудно разрушить. Можно только мечтать об уникальном генополиморфизме и здоровье, которым природа наделила кошку и изучать их во благо человека.

Среди кошек, представляющих исследовательский интерес, различают длинношерстные и короткошерстные породы. Последние наиболее подходят для экспериментальных исследований. При проведении различных физиологических и фармакологических опытов используют изолированные органы кошки (сердце, кишечник, матку, селезенку, почки). На взрослых кошках относительно хорошо экспериментально воспроизводятся стафилококковые инфекции, сап, бешенство, венерическая лимфогранулема, дерматомикозы, глистные инвазии. У котят вызывают экспериментальный коклюш, амебную дизентерию, болезнь Ауэшки, туляремию, холеру.




NB! Кошка является излюбленной биомоделью в электрофизиологических и энцефалографических исследованиях, а также в экспериментальной психофизиологии и психофармакологии, экспертизе и контроле качества лекарственных средств.

Кошки используются для контроля и экспертизы лекарственных средств, оценки токсичности фармпрепаратов и ксенобиотиков.

Кролики

Относятся к отряду зайцеобразных (*Lagomorpha*). В экспериментах чаще всего используются *кролики* породы шиншилла. Их название произошло из-за сходства окраски меха с южноамериканским зверьком. Генетически выведено около 60 пород кроликов, среди них в нашей стране распространение получили фландр, белый великан, серый великан, советский мардер и другие. Кстати, почему у зайцев и кроликов такие большие уши? Оказывается не только для того, чтобы эти животные слышали приближение врага и представляли известное удобство для экспериментатора при заборе крови. Уши спасают их от жары. Через тонкие ушки с большим количеством кровеносных сосудов улетучивается до трети тепла, образующегося при обмене веществ. Благодаря такому строению ушей и их крово-

снабжению, кролики являются удобной моделью для прижизненных манипуляций и перфузии.

Кролики – это почти предел крупных животных для проведения реального *инбридинга*. В поддержании и использовании в эксперименте инбредных кроликов важная роль принадлежит их ранжированию. Ранжирование зависит от того, какие конкретно штаммы были включены в исследования и могут меняться в результате взаимодействия между генотипом и окружающей средой. Были исследованы эстеразы сыворотки преальбумина у ряда штаммов. Во многих штаммах фенотипы были единообразными, что и следовало ожидать от штаммов с высокой степенью инбридинга. Отсутствие *аллели* $Est\text{-}3^D$ в материале было заметно, так как она являлась *преобладающей аллелью* в колониях *диких кроликов*.

NB! Особенности генополиморфизма по NAT и $Est\text{-}3^D$ кроликов создают зону риска для исследователей при изучении на этих животных-моделях фармакокинетики и биотрансформации лекарств и ксенобиотиков. В каждой из выбранных групп будет большая дисперсия и низкая достоверность.




В лабораторной практике используются инбредные линии кроликов A/J, AC/J, ACEP/J, AX/J, AXBU/J, B/J, C/J, X/J, Y/J, III/J [13].

Кролики служат прекрасным биологическим объектом для физиологических, фармакологических и токсико-биологических наблюдений; оценки активности гормональных препаратов (инсулин адреналин и др.); для биологического контроля вакцин (паратифа телят, дизентерии ягнят, сибиреязвенной, противочумной и др. вакцин); проверки активности агглютинирующих сывороток (противостолбнячной противосибиреязвенной и т. д.). Особенности овуляции крольчих делают их классическим объектом для изучения функции яичников. Кролики служат для приготовления гемолитической сыворотки для реакции связывания комплемента, незаменимы для биологической проверки материала на бешенство, для приготовления антирабических вакцин.

Кроликов используют для создания моделей таких заболеваний, как экспериментальные опухоли, карцинома Броун-Пирса и дегтярный рак кожи, а также моделей холестериновой болезни, стафилококковых и стрептококковых инфекций, сибирской язвы, листереллеза, псевдотуберкулеза, сальмонеллеза, столбняка, газовых раневых инфекций, ботулизма, сифилиса. Кроме этого, их используют и для воспроизведения аллергических реакций. У крольчат вызывают бактериальную дизентерию, менингококковые инфекции. Кроликов используют также для установления активности культур возбудителей листереллеза, туляремии, анаэробов, стафилококков. Они незамени-

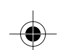
мы при оценке токсичности, изучении эффектов и экспертизе качества лекарств.

Альтернативы изволения

Грызуны не имеют аналогов по широте их использования в биомедицинских исследованиях. Они все шире применяются в биомоделировании в качестве *альтернатив* крупным млекопитающим. Это отнюдь не означает, что грызуны должны или могут использоваться в эксперименте безгранично, их употребление следует всемерно сокращать. Но несмотря на активный поиск *альтернативных моделей*, без этих животных мы, к сожалению, на данном этапе развития фармакологии, токсикологии, и в целом биологии и медицины, обойтись не можем. Хотя на смену грызунам предлагаются земноводные, рыбы, насекомые, нематоды и т.д., — сегодня это вопрос, лежащий скорее в плоскости научных дискуссий, нежели серьезного научного поиска.

Морские свинки

Cavia guinea–pig или *Porcellus* — принадлежит к отряду грызунов. Морские свинки являются классическим объектом для изучения аллергических реакций (анафилаксии), а также авитаминозов С и Р. Изолированные органы морской свинки используют для общефизиологических и фармакологических исследований. У морских свинок можно вызвать такие инфекционные заболевания, как туберкулез, псевдотуберкулез, дифтерию, чуму, лептоспироз, сап, раневые газовые инфекции, столбняк, бруцеллез, туляремию, холеру, листереллез, сальмонеллезы, риккетсиозы, коклюш и др.




NB! Большое количество открытий в области микробиологии сделано благодаря экспериментальным исследованиям на морских свинках. На них проводилось экспериментальное обоснование вакцинации людей, изучены механизмы аллергий и методы десенсибилизации.

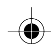
Сыворотка морских свинок содержит много комплемента и используется для постановки реакций Борде–Жангу, Вассермана. Эритроциты морской свинки хороший объект для гемагглютинации в диагностике вируса гриппа. Кроме того, морская свинка служит ценным объектом для выявления возбудителей туберкулеза, сапа, бруцеллеза, чумы и лептоспироза. В Центре РАМН (филиал «Андреевка») в научных целях поддерживаются две популяции неинбредных морских свинок: цветные и альбиносы [8], которые используются в разных институтах, учреждениях и предприятиях фармакотоксикологического и фармацевтического профиля.

Крысы

Биомодели–грызуны являются наиболее распространенными объектами для проведения исследовательских и испытательных экспериментов во всех лабораториях мира. *Крысы* относятся к роду *Rattus*, семейству мышевидных (*Muridae*). Для экспериментальных исследований в лабораториях используют белых крыс, которые являются альбиносами черной и серой пород. Останки крыс обнаружены в археологических находках I и II тысячелетий до н.э. Черная крыса появилась в Европе в XII веке. Места распространения диких крыс связаны с жильем человека.

NB! Важное преимущество *лабораторных крыс* заключается в том, что они довольно устойчивы к инфекционным заболеваниям и дают большой приплод. Небольшой вес лабораторных крыс, относительно простое содержание и разведение их в лабораторных условиях позволяют проводить массовые опыты.

Международной группе генетиков в медицинском колледже Бэйлора (Хьюстон, США) удалось расшифровать геном лабораторной крысы (*Rattus norvegicus*). Крыса стала третьим млекопитающим, геном которого поддался ученым. В геноме крысы 22 хромосомы, около 25 тысяч генов и 2,75 млрд. нуклеотидов. Около 90% крысиных генов встречаются и в геноме человека. В их числе большинство генов, связанных с человеческими заболеваниями. Человеку не достались, в частности, гены, связанные с нюхом, а также гены, отвечающие за разрушение ряда токсинов в организме.




Для медицины и фармакологии намного важнее значительно более мощная у мышей и крыс, чем у человека, система ферментов, обеспечивающих разложение токсинов. Эти ферменты кодирует определенная группа генов цитохромов Р-450. Гены Р450 крысы меньше, чем мышиные, отличаются от аналогичного семейства генов человека.

NB! Испытывать действие, осуществлять экспертизу и контроль лекарств лучше все-таки на крысах, а не на мышах. Дальнейшие исследования геномов людей позволят точнее учесть разницу в системах детоксикации, а возможно, и получить ГМ-линии крыс, у которых эта система будет меньше отличаться от человеческой.

Крысы необходимы для установления токсичности лекарственных веществ и ядов, широко используются при изучении вопросов питания, проведения биологической стандартизации гормональных препаратов, для постановки научных исследований по витаминологии, эндокринологии, биохимии. Используют лабораторных крыс также для воспроизведения на них экспериментальных опухолей (саркомы Кричевского и Синельникова) и инфекционных заболеваний (бешенство, амебиаз, грипп свиней и др.).

Идет активный поиск моделей на трансгенных и нокаутных крысах. Например, у крыс с моделью диабета появляются проинсулин и инсулин-позитивные клетки экстрапанкреатической локализации [22]. В седалищном нерве и в спинном нервном ганглии (СНГ) крыс-диабетиков такие клетки также экспрессировали панлейкоцитарный маркер CD45 и один из маркеров апоптоза –α-TNF. Наряду с трансгенными и нокаутными линиями продолжают широко использоваться инбредные и гибридные линии. Также широко используются в медико-биологических исследованиях и поддерживаются в Центре РАМН и других учреждениях России следующие линии: AUG/LacSto, F344/N, MSUBL/Icgn, WAG/GSto, BDI, LEW, SHR, WKY/N и сток КМ и др. [13], находящие применение в экспериментальных и доклинических исследованиях лекарств.

Хомяки

Относятся к семейству мышиных (*Muridae*) подсемейству хомяковых (*Cricetinae*), в которое входят хомяки и хомячки. По размеру они уступают крысе. Вес взрослого животного составляет 130-150 г. Хомяков и хомячков используют прежде всего для воспроизведения инфекционных заболеваний (туберкулез, лептоспироз, проказа, полиомиелит, сап, бешенство, бруцеллез, коксаки-инфекция, лейшманиоз, токсоплазмоз, вирусный энцефалит, амебная дизентерия, ящур, сибирская язва, столбняк и др.). Кроме того, они используются для изучения авитаминозов, лучевых поражений, проведения разнообразных исследований в областях онкологии, физиологии, патофизиологии и фармакологии. Любая генетически разнородная популяция может быть расчленена на ряд инбредных линий или штаммов. Штаммы сирийских хомячков: ALAC, RL, X3, X.68, 1.5, 1.26, 2.4 (син: LSH), 4.22, 4.24, 12.14, 14.6, 15.16, 45.5, 54.7. В центре РАМН поддерживаются гибриды *F1*, без которых изучение, экспертиза и контроль медицинских иммунологических препаратов попросту невозможны.

Мыши

Для лабораторных целей используют чаще всего *лабораторных мышей* вида *Mus musculus L*, которые принадлежат к отряду грызунов (*Rodentia*), семейству мышевидных (*Muridae*), подсемейству *Murinae*. Как лабораторные животные мыши нашли широкое распространение и в России, и за рубежом.

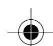
В университете имени Вашингтона в Сент-Луисе удалось практически полностью расшифровать генетический код мыши. Геном мыши содержит двадцать пар хромосом, что составляет около 2,7 миллиардов комплементарных пар оснований нуклеиновых ки-

слот, а у человека двадцать три пары хромосом (около 3,2 миллиардов нуклеотидов).

NB! Генетические коды мыши и человека можно сравнивать практически напрямую. Это позволяет понять принципы функционирования клеток человеческого организма, а также выявлять истинные причины возникновения многих наследственных заболеваний.

Лишь 300 генов человека и мыши принципиально несхожи. Всего же в геномах человека и мыши содержится примерно по 30 тысяч генов. Около 99% генов человека соответствуют генам мыши, а 80% из них абсолютно идентичны. Исследование генома мыши дает важную информацию о функциях многих генов человеческого организма. Установив одинаковый ген, можно создать нокаутных мышей и выяснить, что именно изменится в организме лабораторного животного, сделав вывод о функции гена [1, 36].

Есть, разумеется, и различия. Так, например, генетический код мыши короче человеческого примерно на 14%. Кроме того, у мыши гораздо больше генов, отвечающих за обоняние.



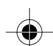

NB! Мышь и человек, как и все прочие млекопитающие, произошли от одного предка размером с небольшую крысу от 75 до 125 млн. лет тому назад. Именно с тех пор, как считают ученые, оба вида наследовали похожий набор генов. Кроме того, до 90% генов, ответственных за возникновение различных заболеваний, у человека и мыши идентичны.

Мышей используют для всевозможных научных целей в биологии, онкологии, токсикологии, фармакологии, физиологии, микробиологии, генетике [1, 13]. Мыши являются наиболее подходящим объектом для определения токсичности химических и биологических препаратов, стандартизации гормональных препаратов, вакцин, сывороток, для изучения злокачественных опухолей, лейкозов, гнотобиотных процессов [6, 13, 20]. Поскольку в количественном отношении мыши не имеют аналогов среди других лабораторных животных по использованию в экспериментах, дадим краткую характеристику используемых линий и их стандартизацию.

Инбредные линии мышей обозначают, например, A2G/Lac Y, где A2G – название линии, Lac и Y – обозначение лаборатории или института, где линия поддерживается. Ниже мы приводим описание инбредных линий мышей, разводимых и поддерживаемых в Центре РАМН в лаборатории биомоделей. Линии, выведенные в Центре РАМН, имеют сублинейный символ **Y**. Линии, поддерживаемые в филиалах отмечены соответствующими символами: ***Sto*** – филиал «Столбовая», ***Kv*** – филиал «Андреевка».

При описании эксперимента указывается число поколений (F) братско-сестринского (б × с) инбридинга, суммарное за известную историю линии, генотип и окраска шерсти, глаз, гаплотип Н-2, гены других полиморфных локусов (если необходимо). Далее дается происхождение линии, ее передача и время поступления, затем приводится краткая характеристика. В Центре РАМН поддерживаются следующие линии: A/HeJ; A/WySnKL; AKR/J; BALB/cJLac; BRSUNT/N; CBA/CaLac,; CBA/J; CC57BR/Mv; CC57W/Mv; C3H/HeDiSn; C3HA/Mv; C57BL/6J; 57BL/10ScSn; C57BL/KsJ–db; C57BL/ 6-W^y; C57L/JY; C58/JY; DBA/1J Lac; DBA/2J; DBA/2JY; 129/JY; HRS/J; I/StY; NZB/BI OrI; NZW/LacY; SWR/JY; TPS/Y; YT/Y; 101/H;129RrJ [13] и другие, всего более 90 линий.

Закрытые колонии (популяции) лабораторных животных, размножаемых любым способом, кроме *инбридинга,* обозначают как *сток*. В филиале «Андреевка» имеются две популяции стока мышей: Kv : SHK и Kv : ICR.




NB! Столетняя история исследований показала, что мать-природа ставит существенные ограничения возможностям инбридинга, причем тем более жесткие, чем более высокоорганизованны животные. Поэтому максимальное разнообразие трансгенных, инбредных, конгенных, конгенно-резистентных, мутантных, нокаутных и иных линий получено именно на мышах.

Мутанты широко применяются в медико-биологических исследованиях, являясь естественными моделями наследственных заболеваний человека. Моделирование наследственных болезней стало возможным в связи с выявлением целого ряда генов, обусловливающих нарушение развития, аналогичное врожденным болезням человека. Для этого мутантный ген переносят на стандартный генотип инбредной линии серией возвратных скрещиваний, в этом случае линия является *конгенной*. Мутантные линии и стоки, поддерживаемые в Центре РАМН: BALB/cY-wal; C57BL – go^Y; C57BL/KsJ-db+/+m; C57BL/6Y-Hi/+; C57BL/6Y-a^tUn^s; C57BL/6-W^Y/+; C57BL/6J-W^x/+; C57BL/6-a^tUn^s; C57BL/10-fz^y; C57BL/10-hr^{rhy}; C57BL/HeJ-pe; C57BL/6Y-smK(smoky); C57BL/6Y-+/Hi,go; B10.CW/Y; (C3Hx101)F1-nu^Y; B10.T/Sn; Ген N утрачен-Splotch; RaSd; ru c^ef; REX; T/t^6; Tabby; Tufted; WR/Y; YT/2; 101.A/Y; 129/Redg-Fu/+; CC57BR-bp^H.

Мыши также используются для изучения патогенеза различных инфекционных заболеваний и для воспроизведения таких заболеваний, как сибирская язва, пастереллез, листереллез, сальмонеллезы, ботулизм, столбняк, раневые газовые инфекции, риккетсиозы, грипп, энцефалиты, пневмококковые инфекции и др. Мыши являются незаменимыми лабораторными животными для разработки проблем наследственности,

для диагностики вирусных и других инфекционных заболеваний. Впрочем, гораздо легче назвать ту область биомедицины, в которой мыши не используются, нежели обозначить все пространство их применения, в особенности в фармакологии и токсикологии.

Земноводные

Они представляют собой первых и наиболее просто организованных наземных позвоночных. К ним относятся саламандры и тритоны, тропические червяги, различные лягушки, жабы, чесночницы, жерлянки. Этот класс — самый малочисленный среди позвоночных, включающий около 3400 видов. Делится на три отряда: безногие, бесхвостые и хвостатые, которые в свою очередь подразделяются на двадцать два семейства. С лягушкой имеют дело работники разных специальностей. Со вскрытия этого животного начинают свое знакомство с наукой о жизни в школе, а биологи и медики — в высшем учебном заведении познают основы физиологии. Исследователи постоянно обращаются к лягушке как к экспериментальному объекту.



NB! Именно эксперименты на лягушках позволили установить основные закономерности функционирования нервов, мышц сердца, гладких и скелетных мышц, и многих других органов и тканей.



Лягушка по-прежнему является объектом исследований. В последние годы интерес к земноводным увеличился, поскольку тритоны стали новой биомоделью оценки микрогравитации и изучения болезни движения в космических полетах. Тритоны — род хвостатых земноводных семейства саламандр. Длина до 18 см (из них около половины — хвост). Известны 10 видов в Европе и прилежащих частях Азии; в России — 3 вида. Интересно, что тритоны способны регенерировать утраченные части тела: гребни, пальцы, хвосты, а иногда даже целые конечности. Живучесть этих амфибий давно известна ученым. Тритоны выживают, даже пробыв некоторое время вмерзшими в лед. Они могут являться удобными моделями для исследования анабиоза, репаративных процессов и их лекарственной регуляции.

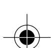
Рыбы

В последние годы рыбы, в особенности трансгенные, занимают все большее пространство в экспериментальных биомедицинских исследованиях. Новым видом лабораторных животных стала аквариумная «рыба-зебра» (zebrafish) *Danio rerio,* которая, наряду с червем *Caenorhabditis elegans*, является удобной биомоделью для изучения регуляции развития организмов от генного до тканевого и организменного уровней.

NB! Геном *Danio rerio*, составляет примерно половину человеческого. Трансгенные рыбы – прекрасные альтернативные модели для фармакологии и токсикологии.

Danio – это идеальный и наиболее часто используемый организм для нейрогенетики. У этой рыбки хорошо развитая сетчатка с четырьмя типами колбочек и палочками, и зрение развито намного лучше, чем у мыши, единственного позвоночного, чья генетика так же хорошо изучена. Выделено большое количество мутантов *Danio* с различными дефектами зрения и определено, где и как эти мутации сказываются на сетчатке. Эффективность генетических методов позволяют думать, что сетчатка *Danio rerio* будет первой, чью структуру изучат от молекулы до целого. Рыбка быстро размножается и имеет много похожих на человеческие генов, что также делает ее хорошим объектом для изучения генетических изменений и их роли в развитии рака.

Меланосомы у одной из форм полосатого *Danio* (zebrafish), которая называется «золотой», имеют меньше пигмента, они меньше по размеру и их меньше в клетках, чем у обычной формы этой рыбки. Это наблюдение навело на мысль о генетическом механизме, который мог бы участвовать в формировании пигментации кожи и у людей. Исследователи обнаружили, что особенности пигментации «золотого» *Danio*, вызываются мутацией в гене SLC24A5 (гене, связанном с развитием рака кожи). Введение в геном «золотого» данио гена от обычной формы *Danio*, привело к восстановлению темного окраса.




NB! Zebrafish хороший претендент для замены млекопитающих. Трансгенных рыб получали введением клонированных молекул ДНК в эмбрион на стадии одного или двух бластомеров.

Икринки с помощью пипетки переносятся в отдельную емкость и оплодотворяются. После оплодотворения в яйцеклетку вводят рекомбинантную ДНК.

Организм нового хозяина начинает активно синтезировать чужеродный белок, структура которого закодирована в «подсаженном» гене. Эти исследования можно заметно ускорить, если пересаживать ген, кодирующий нетоксичный и легко обнаруживаемый белок, синтез которого возможен уже на самых ранних стадиях эмбрионального развития трансгенного организма. Гены, действительно, были выделены сначала из медузы (Aequorea victoria): ген, кодирующий *зеленый флуоресцентный белок* (green fluorescent protein или GFP), и несколько позднее, из морского анемона (Discosoma sp.) – ген, кодирующий *красный флуоресцентный белок* (red fluorescent protein, или RFP). Эти гены стали широко использоваться для совершенствования трансген-

ных технологий и в эмбриологических исследованиях. В настоящее время подобных генов известно уже около десятка.

В дальнейшем были получены сразу три цветные формы *Danio rerio* – красная, оранжевая и зеленая. Оранжевая получается при совместном синтезе GFP и RFP в мышечной ткани у «*дважды трансгенных*» рыб. Национальному институту здравоохранеия (США) выделено 10 млн. долларов для размещения более полумиллиона рыбок в 25 тысячах аквариумов. Хотя zebrafish весьма отдаленный родственник млекопитающих, она имеет с ними много схожего во внутреннем строении и в процессах эмбрионального развития. Ее органы и ткани, такие, как сердце, почки, соединительные ткани, кости, хрящи, кровь во многом аналогичны таковым у высших животных. Каждые 4-5 дней самка способна откладывать до 200 икринок, а следить за развитием эмбрионов можно прямо в чашке Петри.

NB! Аквариумных рыбок гораздо легче содержать, чем тех же мышей, что и определяет нарастающую конкуренцию «жабродышащих».

Геном *Danio rerio*, составляющий примерно половину человеческого, расшифрован в 2005 г. На рыбах легче активировать и нокаутировать определенные гены, исследовать особенности кровообразования, используя генномодифицированных рыбок с флуоресцирующими кровеносными сосудами. Сейчас получают рыбок с пороками, свойственными человеку, такими, как, например, Т-клеточная лейкемия, опухолями, высокочувствительными и оппозитными свойствами к ксенобиотикам и лекарствам. Рыбы и их икринки являются альтернативными биомоделями более «организованных» животных, на которых возможно даже визуально наблюдать эмбриотоксичность лекарств и ксенобиотиков.



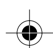

NB! Говоря о выборе оптимальных животных-моделей, т.е. об изволении или изъявлении воли исследователя, следует иметь в виду прежде всего адекватность выбранной биомодели, ее генетическое соответствие прототипу.

Резюмируя изложенные материалы, следует напомнить, что на этапе планирования и анализа результатов экспериментов мы можем апеллировать к экспериментатору, его опыту, эрудиции и интеллекту, но когда рассматриваем фактологические аспекты исследовательской работы, уместно сказать: «Каково животное – таков и результат». Разумеется, животное должно быть также здоровым соматически, но при наличии инфекционной патологии у животных экспериментатор должен проститься с корректным результатом изначально. Работа с больными или генетически контаминированными животными – это *научный суицид*!

Альтернативы для альтернатив изволения

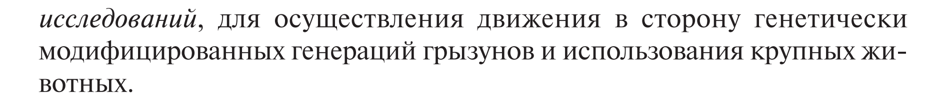
С точки зрения ограничений на использование генетически измененных и нелинейных животных в моделировании болезней человека способами, которые дают в результате много эффективных лекарств, следует все же двигаться от эволюционно менее организованных к более организованным представителям живого мира. Необходим поиск *альтернативных моделей* даже для так называемых *альтернативных животных*. В силу того, что несколько генов включены в эволюцию, возможности выбора, по крайней мере, для предварительных исследований дают такие организмы, как *Caenorhabditis elegans* (нематода) и *Drosophila melanogaster* (насекомое). Более высокая плотность гена, часто более высокая норма мутации и относительная простота, с которой можно манипулировать геномами данных организмов и изучать их, делают важным исследования этих менее высокоразвитых организмов вместо использования высокоорганизованных существ.

Конечно, эти беспозвоночные организмы не отражают всего генотипа человеческого организма. Однако более низкие *нормы дупликации* у этих низших организмов означают, что функциональные нарушения, вызванные мутацией гена, будут иметь большую презентативность нужных генов, поскольку избавлены от других генов. Это упрощает процесс установления функции гена, который у животных сложен ввиду распространения *дупликации генов* и их компенсации. Так как низшие организмы имеют большую скорость воспроизводства и некоторые, подобные *C. elegans,* имеют прозрачное тело, они очень хорошо подходят для изучения эволюционно сохраненных развивающихся генов и процессов.




NB! Такие организмы могут быть более полезны, если целью является разработка превентивного лечения, которое останавливает развитие болезни, хотя, очевидно, необходимы альтернативные модели для лекарств симптоматического и этиопатогенетического действия.

Многие из болезней человека, которые приводят к пренатальной, посленатальной и ранней смерти, весьма сложны для моделирования на животных. Когда есть проблемы с установлением соответствующих исследований на низших организмах, хотя и при наличии возможности использования животных, наиболее практичный путь – использование клеточных культур и популяционной генетики. Такая информация важна для клинических оценок и основанных на клеточных исследованиях механизмов развития болезней человека. Мы надеемся, что все большее внимание будет уделяться нахождению путей использования информации, которая возникает в процессе *альтернативных*



исследований, для осуществления движения в сторону генетически модифицированных генераций грызунов и использования крупных животных.

Общность и различия в фенотипировании и генополиморфизме человека и животных

Целый ряд направлений биомоделирования основывается на исследованиях генетического полиморфизма фенотипов человека и животных. При этом учитываются вопросы медико-биологического характера при установлении генетической компоненты в предрасположенности индивидов к определенным заболеваниям и чувствительности к лекарствам.

В основе метаболизма лекарственных препаратов и ксенобиотиков в организме человека лежит преобразование их в водорастворимые фракции, которые выделяются с мочой. Преобразование медикаментов и ксенобиотиков осуществляется в две фазы, а ферменты, катализирующие их метаболизм, также обладают *генетическим полиморфизмом*, который обеспечивает индивидуальные особенности метаболизма ксенобиотиков и лекарств.




Изучение генетического полиморфизма ферментов метаболизма значимо даже не столько для биохимии и генетики, сколько для фармакологии и токсикологии, так как этот полиморфизм предопределяет индивидуальную чувствительность человека к лекарствам и ксенобиотикам.

NB! Поиск оптимальных фармакологических моделей, выбор животных и альтернативных биомоделей для исследований имеет решающее значение в предупреждении многих проявлений побочных реакций лекарств у человека.

Например, ферменты I фазы, принадлежащие к семейству цитохромов P-450 (CYP4500), являются самыми важными в метаболизме лекарств и ксенобиотиков. Среди изоформ CYP тип CYP2D6 является наиболее активным. Он катализирует метаболизм около 25% всех наиболее клинически важных лекарственных препаратов, таких, как антиаритмические препараты, трициклические антидепрессанты, β-адреноблокаторы и другие. С целью поиска оптимальной биомодели генетического полиморфизма человека в лабораториях биомедицины и биобезопасности нашего Центра были проведены исследования на мини-свиньях. С этой целью определяли генетический полиморфизм таких ферментов метаболизма, как цитохром-С-редуктаза, цитохром P-450 и глютатион-S-трансфераза. Было показано, что активность цитохром-С-ре-

дуктазы у взрослых мини-свиней на всех изученных сроках остается одинаковой. Активность цитохрома Р-450 повышается с 7 до 18, а затем остается без изменений. У мини-свиней в возрасте от 7 до 22 месяцев отмечается повышение активности глютатион-S-трансферазы.

К числу важных ферментов метаболизма фазы II принадлежат ферменты из семейства *ариламин N-ацетилтрансфераз.* Эти ферменты играют важную роль в биотрансформации ряда ароматических и гетероциклических аминов и гидразинов, которые содержаться в лекарствах, а также в окружающей среде. В Центре ведется работа по изучению полиморфизма генов *NAT* и связи этого полиморфизма с функцией у мини-свиней и мышей различных инбредных линий. При помощи праймеров, распознающих консервативные участки в генах *NAT*, были амплифицированы, и впоследствии клонированы фрагменты геномной ДНК мышей линий DBA2 и BALB/c, CBA, C57BL/6 и C57BL/10 (рис. 2.8), сирийских хомяков, крыс и мини-свиней светлогорской популяции (рис. 2.9) [12].



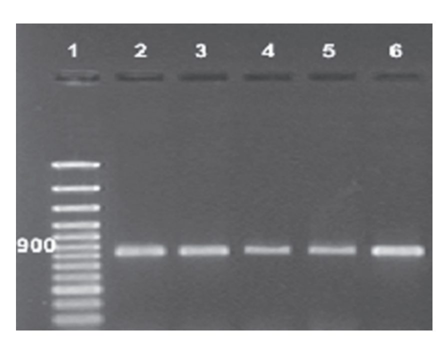
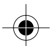


Рис. 2.8. Результаты амплификации геномной ДНК мышей пяти инбредных линий с праймерами, специфичными для гена NAT2. Трек 1 – маркер молекулярной массы; треки 2-6 – мыши линий BALB/c, CBA, DBA2, C57BL/6 и C57BL/10. 900 – размер фрагмента маркера в парах нуклеотидов [12]



Реакция ацетилирования, необходимая для функционирования цикла Кребса, синтеза стероидов и жирных кислот, в процессах *метаболизма* или *биотрансформации* ксенобиотиков, включающих лекарственные препараты, бытовые и промышленные яды, является одним из самых ранних механизмов адаптации. Реакция ацетилирования осуществляется ферментом *N-ацетилтрансферазой* и *коферментом А*. В организме человека интенсивность ацетилирования находится под контролем β-адренорецепторов, пантотеновой кислоты, пиридоксина, тиамина и липоевой кислоты и зависит от функционального состояния внутренних органов и печени, в которых содержится N-ацетилтрансфераза. Всего выделено 2 изофермента: *N-ацетилтрансфераза 1* (NAT1) и *N-ацетилтрансфераза 2* (NAT2). NAT2 – белок, состоящий из 290 аминокислотных остатков, с молекулярной массой 33 кДа и локализующийся в цитоплазме клеток. Ген его находится в 8-й хромосоме, локусе 8p23.1 – p21.3.

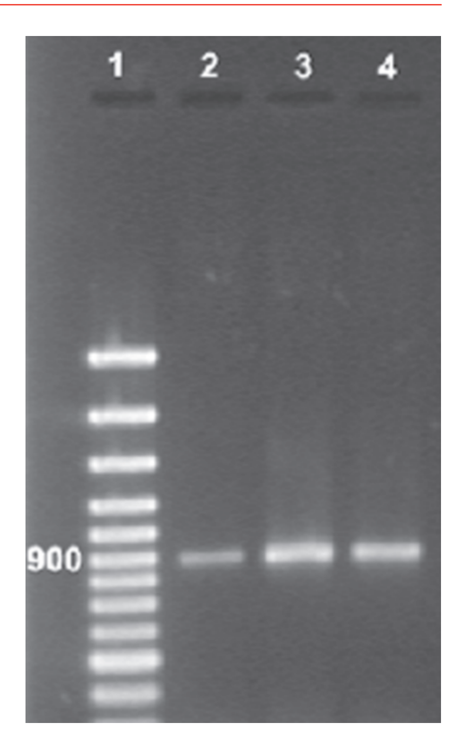
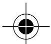


Рис. 2.9. Результаты амплификации геномной ДНК мини-свиней светлогорской популяции с праймерами, универсальными для генов NAT. Трек 1 – маркер молекулярной массы; треки 2-4 – мини-свиньи. 900 – размер фрагмента маркера в парах нуклеотидов

Оба изофермента генетически полиморфны, то есть имеют несколько аллелей. Присутствие той или иной аллели в генотипе влияет на скорость метаболизма лекарственных средств и может быть причиной различных нежелательных эффектов. Поэтому аллельный состав генов *NAT* необходимо учитывать при проведении доклинических испытаний новых препаратов на животных-моделях.

У человека основным ферментом ацетилирования ряда лекарственных препаратов, в частности изониазида и сульфаниламидов, является NAT2, а NAT1 ацетилирует ариламины. К лекарствам, подвергающимся ацетилированию NAT2, относятся сердечно-сосудистые средства (прокаинамид, гидралазин), сульфаниламиды (сульфасалазин, сульфаметоксозол, сульфадиазин, сульфацетамид), ингибиторы стероидогенеза (аминоглутетимид), противотуберкулезные препараты (изониазид, ПАСК), бензодиазепины (нитразепам), а также кофеин, ПАБК и другие [12, 14].





NB! *Генетический полиморфизм* одно из важных свойств NAT2 как у человека, так и у животных. Выделены «*медленные*» и «*быстрые*» *ацетиляторы* изониазида [2]. «Медленные» ацетиляторы являются гомозиготами по «медленной» аллели NAT2, а «быстрые» метаболизаторы являются гомозиготами или гетерозиготами по «быстрой» аллели NAT2.

Оценены мРНК, уровни экспрессии протеина и стабильность протеина. Не было найдено различий в экспрессии наблюдаемых NAT2*4 и NAT2*5B. Однако NAT2 5B и NAT2 5D, но не NAT2 6D и NAT2 14G экспрессии протеина были существенно ниже, чем NAT2 4. В противоположность, NAT2 6D были легче (в 3.4 раза), и NAT2 14G был существенно (в 29 раз) менее стабилен, чем NAT2 4. Эти результаты предполагают, что 341T → C (Ile^{114} → Thr) общий для кластера

NAT2*5 достаточен в редукции и экспрессии протеина NAT2. Механизм медленного ацетилятора фенотипа отличается для аллелей NAT2, которые не содержат 341T → C, она содержится в кластерах NAT2*6 и NAT2*14. Различия в механизмах медленной ацетиляции у людей связаны с множественной медленной ацетиляцией фенотипов.

Генетические вариации в NAT2 показывают предрасположенность людей к раку, индуцированному окружающей средой. Около 50% большинства не-азиатского населения являются фенотипом с медленной ацетиляцией, они чаще испытывают воздействие токсических веществ из многих ароматических аминов и лекарств. Медленные ацетиляторы также показывают предрасположенность к раку мочевого пузыря от канцерогенов ароматических аминов. Показано, что самый медленный ацетиляторный фенотип имеет наивысшую заболеваемость раком мочевого пузыря.

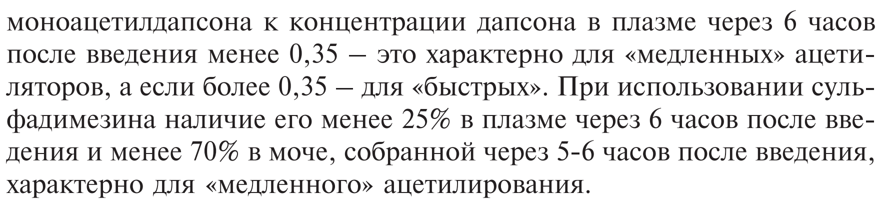
Первоначальные исследования показали, что низкий ацетиляторный фенотип соответствовал снижению или отсутствию N-ацетилтрасферазы печени. Комбинация полиморфизма 341T → C/481C → T и полиморфизма 590G → A в коде NAT2 приводят к уменьшению экспрессии рекомбинантного протеина NAT2 человека в клетках COS-1. Более того, исследования показали полиморфизм 590G → A и 857G → A в кодирующей области NAT2, которые были связаны с уменьшением экспрессии протеина NAT2 в печени человека и снижением экспрессии рекомбинантного протеина NAT2 в клетках яичников у китайских хомяков. Изучение рекомбинантной экспрессии в прокариотической системе, однако, не показало снижения экспрессии рекомбинантного протеина NAT2, связанного с медленными ацетиляторными аллелями.




NB! Молекулярные механизмы отклика на медленные ацетиляторные фенотипы остаются не полностью понятными.

Изучение связи генотипов NAT2 с раком выявлены три новые аллели NAT2. Новые аллели NAT2 вместе с наиболее общими быстрыми (NAT2*4) и медленными (NAT2*5B) ацетиляторами аллелей NAT2 были охарактеризованы рекомбинантной экспрессией в дрожжах (*Schizosaccharomyces pombe*), а у человека относятся к медленному ацетиляторному фенотипу. Среди представителей европеоидной расы распространенность «медленных» ацетиляторов составляет около 50%, а среди монголоидов до 15%. В настоящее время идентифицированы около 15 мутантных аллелей гена NAT2, приводящие к «медленному» ацетилированию.

Тип ацетилирования определяется как фенотипированием, так и генотипированием NAT2, а в качестве маркерных субстратов широко используются *дапсон* и *сульфадимезин*. Если отношение концентрации



моноацетилдапсона к концентрации дапсона в плазме через 6 часов после введения менее 0,35 – это характерно для «медленных» ацетиляторов, а если более 0,35 – для «быстрых». При использовании сульфадимезина наличие его менее 25% в плазме через 6 часов после введения и менее 70% в моче, собранной через 5-6 часов после введения, характерно для «медленного» ацетилирования.

Как мы выше указали, в Научном центре при изучении полиморфизма генов NAT и связи этого полиморфизма с функцией ацетилирования у мини-свиней и мышей различных инбредных линий при помощи праймеров, распознающих консервативные участки в генах *NAT*, были амплифицированы и впоследствии клонированы фрагменты геномной ДНК мышей линий DBA2 и BALB/c и мини-свиней светлогорской популяции (рис. 2.8 и 2.9). Сравнение нуклеотидных последовательностей этих фрагментов с уже известными последовательностями генов NAT1 и NAT2 показало, что полученные фрагменты принадлежат генам семейства NAT у исследованных животных. При этом, в случае мини-свиней полученный ген оказался геном NAT1, а в случае мышей – геном NAT2.




NB! Гомология гена мини-свиньи с генами NAT1 у других представителей класса млекопитающих составила 89%, причем 87% для кошки (*Felis catus*), 87% для коровы (*Bos taurus*), 86% для шимпанзе (*Pan troglodytes*), 86% для макаки (*Macaca mulatta*), 78% для человека (*Homo sapiens*) и 78% для мыши (*Mus musculus*) и крысы (*Rattus norvegicus*). Амплифицировать ген NAT2 у свиньи нам пока не удалось [12].

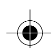
Что касается генов NAT2, полученных нами у двух инбредных линий лабораторных мышей, то эти два клона оказались абсолютно идентичны как между собой, так и по сравнению с сиквенсами этого гена у других линий мышей, найденными нами в генетическом банке. Эти результаты свидетельствуют о высокой генетической однородности мышей различных инбредных линий по гену NAT2. Гомология генов NAT2 мыши и человека составила 80%. Известны и мутантные аллели гена NAT2 у человека, приводящие к медленному ацетилированию. Эти аллели содержат следующие нуклеотидные замены: 191G→A, 282C→T, 341T→C, 481C→T, 590G→A, 803A→G и 857G→A.

В полученных нами сиквенсах генов NAT2 у мышей в этих положениях находятся следующие нуклеотиды: 191G, 282T, 341T, 481T, 590G, и 803G, нуклеотид 857 не был апмлифицирован. Нетрудно заметить, что у мышей в указанных позициях находятся либо нуклеотиды, соответствующие «нормальной» аллели человека (191, 341, 590), либо нуклеотиды, аналогичные замещающим нуклеотидам в мутантных человеческих аллелях (282, 481, 803). Из этого можно сделать вывод о

консерватизме как «нормальных», так и замещающих нуклеотидов в этих позициях. Однако пока не известно, являются ли эти положения и замены в них функциональными у мыши, также как у человека [12].

NB! Ацетиляционный полиморфизм связан не только с различными устойчивостями к токсичности лекарств, но и онкозаболеваниями, вызванными ароматическими и гетероцикличными аминами.

N-ацетиляция является катализом двух цитозольных N-ацетилтрансфераз (NAT1 и NAT2), которые обезвреживают многие карциногенные ароматические амины. NAT1 и NAT2 также активируют N-гидроксилметаболиты ароматических и гетероцикличных аминных карциногенов до составляющих, которые влияют на ДНК и инициируют рак. Классический N-ацетиляционный полиморфизм регулируется локусом NAT2, который сегрегирует индивидуумов в быстрые, средние и медленные ацетиляторные фенотипы.




Некоторые эпидемиологические исследования на людях связаны с медленными и быстрыми ацетиляторными фенотипами с повышением чувствительности в мочевом пузыре и колоректальным раком, соответственно. Ацетиляционный полиморфизм был охарактеризован в трех типах грызунов и у мини-свиней для проверки связи между ацетилятором фенотипа NAT2 и восприимчивостью к ракам, вызванным ароматическими и гетероцикличными аминами в различных целевых органах опухоли.

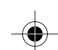
Были клонированы и последовательно представлены NAT1 и NAT2 из быстрых и медленных ацетиляторных мышей, сирийского хомяка и крысы. Рекомбинанты NAT1 и NAT2 энзимов раскодированы, коды этих генов характеризовали их каталитическую активность по активации (О-ацетиляция) и деактивации (N-ацетиляция) ароматических и гетероцикличных аминных карциногенов.

Ацетиляторный полиморфизм у мини-свиней, мышей, сирийского хомяка и крысы может быть описан как модель гена полиморфизма человека и использован в качестве адекватной биомодели, характеризующей, с одной стороны, общность и различия в фенотипировании и генетическом полиморфизме человека и животных, а с другой — открывающий новые перспективы поиска и изучения инновационных лекарств.

Литература

1. *Алексеев В.И.* Нокаутные животные / *В кн.: Актуальные вопросы иммунопатологии. — СПб, с. 76-82, 2007.*
2. *Алтухов Ю.А* (ред.) Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях. — *М.: Наука, 619 с., 2004.*

3. *Бескова Т.Б., Малашенко А.М., Болотских Л.А.* Сравнение кластогенного эффекта канцерогена бензпирена у мышей, выращенных в гнотобиологическом изоляторе и в открытой среде // *Биомедицина, № 1, с. 108-111, 2006.*
4. *Бландова З.К., Душкин В.А., Малашенко А.М. и др.* Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. – *М., Наука, 1983.*
5. *Бландова З.К.* Гомозиготность мышей инбредных линий коллекционного фонда научно-исследовательской лаборатории экспериментально-биологических моделей АМН СССР в опытах с трансплантацией кожи / *В кн.: Использование лаб. животных в разработке, производстве и контроле биологических медицинских препаратов. – М., с. 194-196, 1976.*
6. *Болотских Л.А., Лушникова З.С.* Усовершенствованный способ получения гнотобиологических животных // *Биомедицина, № 1, с. 114-117, 2006.*
7. *Бочков Н.П.* Клиническая генетика. – *М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002.*
8. *ИвановД.Б.* Основы сложноорганизованного поведения. – *СПб.: Марс, 187 с., 2007.*
9. *Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д.* ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии. – *М.: МИА, 2002.*
10. *Капанадзе Г.Д.* Использование миниатюрных свиней в биомедицинских экспериментах // *Биомедицина, № 2, с. 40-51, 2006.*
11. *Капанадзе Г.Д., Ашуев Ж.А.* Светлогорская популяция мини-свиней // *Биомедицина, № 6, с. 71-80, 2007.*
12. *Каркищенко В.Н., Мартынов В.В.* Фармакология, генополиморфизм и клонирование генов NAT у человека и животных-моделей // *Биомедицина, № 4, с. 85-87, 2006.*
13. *Каркищенко Н.Н.* Основы биомоделирования. – *М.: Изд-во ВПК, 607 с., 2004.*
14. *Каркищенко Н.Н.* Психоунитропизм лекарственных средств. – *М.: Медицина, 1993.*
15. Лабораторные животные (Положение и руководство) / Под ред. и при участии чл.-корр. РАМН Н.Н.Каркищенко. – М.: Изд-во «ВПК», 138 с., 2003.
16. *Малашенко А.М., Игнатьева Е.Л., Бескова Т.Б.* Моделирование периодически меняющегося прогнозируемого ответа на мутагенные воздействия у мышей CBA/LacY в ряду поколений инбридинга // *Генетика, том 37, № 10, с. 1353-1357, 2001.*




17. *Медведев Н.П., Ольховская И.Г.* К онкологической характеристике мышей CC57BR и CC57W // *Вопр. онкологии, т. 20, № 5, с. 84-87, 1974.*
18. *Мендель Г., Ноден Ш., Сажрэ О.* Избранные работы. *М., 1968.*
19. *Побезинская Е.Л., Побезинский Л.Н и др.* Красс-реактивность Т-клеточного рецептора клона клеток памяти CD8+, полученного в ответ на иммунизацию клетками аллогенной опухоли // *Бюлл. эксп. биол. и мед., 137, № 5, с. 563, 2004.*
20. *Покровский В.И.* Медицинские проблемы биобезопасности // *Вестник РАМН, 10, 6, 2002.*

21. *Сингер М., Берг П.* Гены и геномы. В 2 т. – *М.: Мир, 1998.*
22. *Степанова О.И., Каркищенко Н.Н.,.Онищенко Н.А, Степанова Е.А.* Коррекция патогенетических нарушений при сахарном диабете второго типа методами клеточной трансплантации // *Биомедицина, № 1, с. 35-51, 2006*.
23. *Aasen T., Hodgins M.B., Edward M. et al.* The relationship between connexins, gap junctions, tissue architecture and tumour invasion, as studied in a novel *in vitro* model of HPV-16-associated cervical cancer progression // *Oncogene, 22, pp. 6025-6036, 2003.*
24. *Conlee K.M., Hoffeld E.H., Stephens M.L.* A demographic analysis of primate research in the United States // *ATLA, 32, Suppl. 1, pp. 315-322, 2004.*
25. *Defris D.G.* Reporting of the metabolic rates in the animal facility // *Lab. Animal, 33, p. 28, 2007.*
26. *Festing M.F.W.* Inbred strains in biomedical research // *ATLA, 26, pp. 283-301, 2002.*
27. *Festing M.F.W.* International index of laboratory animals // *Carshalton: MRC Lab. Anim. Centre, 141, 1980.*
28. *Festing M.F.W., Blackmore D.* Life span of specified-pathogen-free MRC category 4 mice and rats // *Lab. Anim., 5, pp. 179-192, 1971.*
29. *Ford E.B.* Polymorphism and taxonomy // *The New Systematics. Oxford: Clarendon press, pp. 493-513, 1940.*
30. *Friedrich M.J.* Studying cancer in 3 dimensions: 3-D models foster new insights into tumorigenesis // *J. Am. Med. Association, 290, pp. 1977-1979, 2003.*
31. *Link R.P., Pensinger R.R.* Lead toxicosis in swine // *Am. J. Vet. Res., 759, 1966.*
32. *Lloyd W.E., Buck W.B.* Technique for semipermanent cannulation of ureters in bovine, ovine, porcine and canine species // *Am. J. Vet. Res., 817, 1971.*
33. *Mayor S.* Research bodies disappointed by decision to cancel primate research laboratory // *British Medical Journal, 328, 306, 2004.*
34. *Moore J., Hout W.S.* Historical of biological applied to some data // *Acta Biol. Latinamerica, 8, pp. 195-209, 2007.*
35. *Morton D.B.* The welfare of non-human primates in research in the EU // *ATLA, 32, Suppl. 1, p. 307, 2004.*
36. *Plomin R., McGuffin P.* Psychopathology in the postgenomic era // *Annu. Rev. Psychol., v.54, pp. 205-228, 2003.*
37. *Sauer U.G.* The moral standing of non-human primates: Why they merit special consideration // *ATLA, 32, Suppl. 1, pp. 309-313, 2004.*
38. *Wright S.* Coefficient of inbreeding and relationship // *Amer. Natur. Vol.16, p. 97, 1922.*
39. *Wright S.* The genetical structure of populations // *Ann. Eugenics. Vol. 15, p. 323, 1951.*
40. *Yang A.J., Dave F.T.* Delivery of germfree animals // *Scand. Fed. Proc. Vol. 20, pp. 68-75, 2007.*